

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POST-GRADO

**Identificación y caracterización de integrones y su
asociación con la resistencia a antibióticos en cepas de
Vibrio spp. aisladas de ambientes marinos
contaminados de Lima-Perú**

TESIS

Para optar al Grado de Magister en Biología Molecular

AUTOR

Marcos Alejandro Sulca Lopez

Lima-Perú

2011

*A mis padres, Marcos y Gertrudis,
gracias por su sacrificio y esfuerzo.*

Sea como las olas del mar... que aún rompiendo contra las rocas... encuentra fuerza para recomenzar (S. Bambarèn)

Hay tres cosas que nunca vuelven atrás: la flecha lanzada, la palabra pronunciada y la oportunidad perdida (Proverbio Chino)

“Cuando llegues al límite de tus fuerzas, haz acopio de lo que te reste y aguanta” (Franklín D. Rossevelt)

"Es mejor escuchar poco y entender que escuchar mucho y no hacerlo" (NIRVANA SUTRA)

La mayoría de la gente se avergüenza de la ropa raída y de los muebles destartalados, pero más debería ruborizarse de las ideas andrajosas y de las filosofías gastadas (ALBERT EINSTEIN)

*“Una mente irreflexiva es un pobre techo. La lluvia de la pasión inundará la casa. Pero al igual que la lluvia no puede atravesar un techo fuerte, tampoco las pasiones pueden penetrar en una mente ordenada.”
Dhammapada 1:13-14*

“Las experiencias son los libros que necesitamos” YO ☺... y no hace falta decir que la experiencia se adquiere después de una cadena de errores. :-):P

*Quiero recalcar algo más, un poco al margen
del tema de este brindis: aunque lo exíguo de
nuestras personalidades nos impiden ser
voceros de su causa, creemos, y después de este
viaje más firmemente que antes, que la división
de América en nacionalidades inciertas e
ilusorias es completamente ficticia.
Constituimos una sola raza mestiza que desde
México hasta el Estrecho de Magallanes
presentando notables similitudes etnográficas.
Por eso, tratando de quitarme toda carga de
provincianismo exíguo, brindo por Perú y por
América unida (Ernesto Guevara de la Serna.
Diarios de motocicleta).*

AGRADECIMIENTOS

- Deseo agradecer grandemente a la Blga Rita Orozco Moreyra, por el apoyo que me ofreció desde el inicio hasta el final de la tesis, así también a la Blga Violeta Flores y al Téc. Juan Santos Villazante por el apoyo y los momentos gratos que compartimos juntos en el laboratorio de Microbiología Acuática del Centro de Investigaciones Acuícolas “Alexander Von Humbolt” - IMARPE.
- Mi agradecimiento a la profesora Mag. Biol. Débora Alvarado Iparraguirre, por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de tesis y por su asesoramiento, compartiendo conmigo sus experiencias y conocimientos en el campo de la investigación.
- A los profesores: Dr. Pablo Ramírez Roca, Dra Ruth Garcia De la Guarda por seguir dándome la oportunidad de formarme profesionalmente en lo referente a la docencia e investigación.
- A los chicos del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Fac. CCBB - UNMSM, gracias por brindarme su amistad y su tiempo.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN.	4
II. ANTECEDENTES	6
2.1 Género <i>Vibrio</i>	6
2.1.1 Importancia de los Vibrios en la salud pública	6
2.1.2 Importancia de los Vibrios en la producción acuícola	6
2.2. Genoma del Género <i>Vibrio</i> .	7
2.3 Integrones	8
2.3.1 Partes de un Integrón	9
2.3.2 Difusión de los integrones	10
2.3.3 Integrasa	11
2.3.4 Genes <i>cassettes</i> y elementos 59 pb (sitio <i>attc</i>)	12
2.3.5 Inserción y expresión del <i>cassette</i> génico	13
2.3.6 Participación del promotor en la expresión del <i>cassette</i>	14
2.3.7 Función biológica del integrón	14
2.3.8 Tipos de integrones	15
2.3.8.1 Integrones de Clase 1	16
2.3.8.2 Integrones de Clase 2	16
2.3.8.3 Integrones de Clase 3	17
2.3.8.4 Integrones de Clase 4 o Superintegrón (SI)	18
2.4 Integrones en ambientes naturales	19
2.5 Vibrios e integrones en el medio ambiente marino	20
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
3.1 Hipótesis	21
3.2 Objetivos	21

3.2.1	Objetivo General	21
3.2.2	Objetivos Específicos	21
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1	CEPAS BACTERIANAS	23
4.1.1	Reactivación de las cepas en stock	23
4.1.2	Toma de muestras	23
4.1.2.1	Transporte y procesamiento de la muestra	23
4.1.2.2	Aislamiento de <i>Vibrio</i>	25
4.1.2.3	Enriquecimiento selectivo	25
4.1.2.4	Aislamiento de las cepas	25
4.1.2.5	Selección de las colonias	25
4.2	IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS	25
4.2.1	Pruebas bioquímicas y convencionales.	25
4.2.2	Identificación Bioquímica con el sistema API 20 NE	26
4.2.1.1	Preparación de la galería o cámara de incubación	26
4.2.1.2	Preparación del inóculo	26
4.2.1.3	Inoculación de la suspensión en la galería	26
4.2.1.4	Lectura e interpretación del API 20 NE	26
4.2.1.5	Identificación de la cepa de <i>Vibrio</i> L22 por PCR	27
4.3	DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS CLÍNICOS	27
4.3.1	Discos de antibióticos probados	27
4.3.2	Evaluación de la resistencia microbiana	27
4.3.3	Lectura y análisis del antibiograma	28
4.4	EXTRACCIÓN DEL DNA	28
4.4.1	Preparación de las células	28

4.4.2 Lisis de las células	29
4.4.3 Recuperación del DNA	29
4.4.4 Aislamiento del cromosoma 2	29
4.4.4.1 Preparación de las células	29
4.4.4.2 Lisis de las células	29
4.4.4.3 Recuperación del cromosoma 2	30
4.5 DISEÑO DE INICIADORES PARA PCR	31
4.6 AMPLIFICACIÓN DE LA INTEGRASA, 16S Y GENES DEL SUPERINTEGRÓN POR PCR	31
4.6.1 <i>Primers</i> o iniciadores	31
4.6.2 Mezcla de reacción para la amplificación	32
4.6.3 Condiciones de la PCR	32
4.7 Confirmación de la presencia de genes de función metabólica o de virulencia reportados para el superintegrón	32
4.8 Visualización de los productos de PCR	32
4.9 Secuenciamiento de los productos de PCR del gen <i>intl4</i> y 16S en la cepa de <i>Vibrio</i> L22	34
4.9.1 Análisis del secuenciamiento	34
V. RESULTADOS	35
5.1 Identificación de las cepas	35
5.2 Resistencia a antimicrobianos clínicos	35
5.3 Presencia del Cromosoma 2	38
5.4 Presencia del integrón de clase 1, 2, 3 y del superintegrón	38
5.4.1 Presencia del gen <i>intl4</i> en el cromosoma 2 aislado	39
5.5 Relación entre la resistencia a antibióticos y la presencia de integrones	44
5.6 Identificación molecular de la cepa L22 por el análisis del gen 16S	44
5.7 Presencia de los genes de virulencia	47
5.8 Confirmación de la presencia de genes de función metabólica o de virulencia reportados para el superintegrón	48

VI. DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. RECOMENDACIONES	58
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
X. ANEXOS	70
Anexo 1. Ubicación de las estaciones	76
Anexo 2. Organigrama del aislamiento de los Vibrios	81
Anexo 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas de Vibrio	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Representación circular del genoma de <i>V. cholerae</i> .	7
Fig. 2 Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de <i>cassettes</i> genéticos de resistencia.	9
Fig. 3 Estructura del integrón de clase 2 en <i>Tn7</i> .	17
Fig. 4 Representación esquemática del integrón de clase 3 In3-p22K9 y sus regiones flanqueantes en el plásmido p22K9.	17
Fig. 5 Puntos de monitoreo de donde fueron colectadas las muestras de agua para el aislamiento de los <i>Vibrios</i> .	25
Fig. 6 Frecuencia de resistencia a cada antibiótico probado en las cepas de <i>Vibrio</i> .	36
Fig. 7 Representación del Cromosoma 2 aislado en la cepa de <i>Vibrio</i> L22.	38
Fig. 8 Amplificación por PCR del gen <i>intl4</i> del integrón de clase 4 o superintegrón en la cepa de <i>Vibrio</i> L22.	39
Fig. 9 Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>intl4</i> en la cepa L22 con el iniciador INT-4D.	40
Fig. 10 Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>intl4</i> en la cepa L22 con el iniciador INTI4-1F.	41
Fig. 11 Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>intl4</i> en la cepa L22 con el iniciador INT-4U.	42
Fig. 12 Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>intl4</i> en la cepa L22 con el iniciador INTI-2R.	43
Fig. 13 Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>16S</i> en la cepa L22 usando el iniciador 27f.	45

Fig. 14	Cromatogramas del secuenciamiento del gen <i>16S</i> en la cepa L22 con el iniciador 536r.	46
Fig. 15	Amplificación del gen <i>mutT</i>, transposasa OrfAB e <i>HigAB</i>.	47
Fig. 16	Presencia del <i>mutT</i> en el superintegrón de la cepa de <i>Vibrio</i> L22.	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de las integrasas y condiciones del PCR para la amplificación.	33
Tabla 2. Iniciadores utilizados para el secuenciamiento de los fragmentos.	34
Tabla 3. Frecuencia de las cepas identificadas de <i>Vibrio</i> .	35
Tabla 4. Frecuencia de los espectros de resistencia a antibióticos de uso comercial producidos en las cepas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas en el mar Limeño.	37

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
g	Gravedad
Kb	Kilo pares de bases
Mg ²⁺	Iones de Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
mV	Milivoltio
NaCl	Cloruro de Sodio
PCR	Reacción en Cadena por la Polimerasa
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
%	Por ciento
spp	Especie
TAE	Tris-base, ácido acético, EDTA
U	Unidades de <i>Taq</i> polimerasa
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitro

RESUMEN

La diseminación de la resistencia a drogas en microorganismos ha sido atribuida a la movilización de marcadores de resistencia ya sea por plásmidos, transposones e integrones. Los integrones tienen la particularidad de integrar *cassettes* génicos de resistencia por lo que su detección y el tipo de resistencia que pueden expresar en sus hospederos indicaría un posible riesgo de salud pública. Se realizó la identificación de 170 cepas de *Vibrio spp* aisladas de diferentes puntos de monitoreo del litoral limeño, entre los años 2006 y 2008, mediante pruebas bioquímicas, API20 NE y PCR. Se evaluó la resistencia a 15 antibióticos de uso clínico: Cloramfenicol (C), Norfloxacin (Nor), Amikacina (Ak), Kanamicina (K), Ampicilina (A), Penicilina (P), Tetraciclina (Te), Aztreonam (Az), Ceftazidima (Caz), Gentamicina (Ge), Amoxicilina (Amx), Nitrofurantoína (Nit), Cotrimoxazol (Sxt), Ácido Nalidíxico (W) y Ciprofloxacina (Cip); se relacionó la resistencia mostrada con la presencia de integrones de clase 1, 2, 3 y 4. Se identificó diez especies como *V. alginolyticus* (71,18%), *V. vulnificus* (10,0%), *V. parahaemolyticus* (4,12%), *V. carchariae*, *V. damsela* (2,94%); *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* (2,35%); *V. mimicus*, *V. cholerae* (1,18%). El 100% de las cepas es resistente a ampicilina, penicilina y amoxicilina; 22,9% a nitrofurantoína, 18,2% a kanamicina, 14,7% a amikacina, 8,82% a aztreonam, 2,4% a ciprofloxacina, 1,8% a gentamicina, 0,6% a ceftazidima, a cloramfenicol, cotrimoxazol y a ácido nalidíxico. Ninguna de las cepas presentó resistencia a norfloxacin y tetraciclina. Sólo se logró identificar la integrasa del superintegrón (SI), el gen *intI4*, mediante pruebas de PCR en una cepa de *V. cholerae* L22, a la cual se evaluó la resistencia a la fosfomicina y la presencia de genes metabólicos o de virulencia en el SI, encontrándose sólo el gen relacionado a la familia de proteínas *MutT* asociado al mismo. Los resultados obtenidos no muestran relación entre la resistencia a antibióticos y la presencia del superintegrón encontrado. Destaca la expresión de resistencia a ciprofloxacina y amikacina de la cual no hay muchos reportes; otras investigaciones muestran mayor variedad de resistencia frente a antibióticos, especialmente en cepas de origen clínico.

Palabras clave: *Vibrio*, resistencia a antibióticos, integrones, genes *cassettes*, superintegrón.

ABSTRACT

The spread of drug resistance in microorganisms has been attributed to the mobilization of resistance markers by plasmids, transposons and integrons. Integrons can integrate gene cassettes of resistance and its detection and the type of resistance that can be expressed in their hosts, indicate a potential public health risk. Identification was carried out of 170 strains of *Vibrio* spp isolated from different monitoring points liman coast, between 2006 and 2008, by biochemical tests and PCR API20 NE. We evaluated the resistance to 15 antibiotics in clinical use: Chloramphenicol (C), Norfloxacin (Nor), amikacin (Ak), Kanamycin (K), ampicillin (A), penicillin (P), tetracycline (Te), Aztreonam (Az) , Ceftazidime (CAZ), gentamicin (Ge), amoxicillin (Amx), nitrofurantoin (Nit), cotrimoxazole (SXT), nalidixic acid (W) and ciprofloxacin (CIP), the resistance to antibiotics was associated with the presence of class 1 integrons , 2, 3 and 4. Ten species were identified as *V. alginolyticus* (71.18%), *V. vulnificus* (10.0%), *V. parahaemolyticus* (4.12%), *V. carchariae*, *V. damsela* (2.94%); *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* (2.35%); *V. mimicus*, *V. cholerae* (1.18%). 100% of the strains are resistant to ampicillin, penicillin and amoxicillin, 22.9% to nitrofurantoin, 18.2% to kanamycin, amikacin 14.7%, 8.82% to aztreonam, 2.4% to ciprofloxacin, gentamicin 1.8%, 0.6% to ceftazidime, to chloramphenicol, to cotrimoxazole and nalidixic acid. None of the strains were resistant to norfloxacin and tetracycline. Was identified only the integrase of superintegrón (SI), gene *intI4* by PCR test in a strain of *V. cholerae* L22, which was evaluated the resistance to fosfomicin and the presence of metabolic or virulence genes in the superintegron, only *mutT* gene was found with the superintegron. The results show no relationship between resistance to antibiotics with the presence of the superintegrón found. Distinguish the expression of resistance to ciprofloxacin and amikacin which there are not many reports, other studies show greater variety of resistance to antibiotics, especially in clinical strains.

Keywords: *Vibrio*, antibiotic resistance, integrons, cassettes gens, superintegrón.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias autóctonas de ambientes marinos como las del género *Vibrio* son microorganismos halófilos, bacilares rectos y curvos, Gram negativos, quimiorganotróficos, de metabolismo aerobio, fermentativo y anaerobio. Algunas especies de este género son patógenos para el ser humano, de éstos, los más notables son *Vibrio cholerae* O1 y *V. cholerae* O139, los cuales son agentes etiológicos de la pandemia conocida como El Cólera (Vora *et al.*, 2005). Algunas especies de este género afectan también a la producción acuícola. Así también, un problema que presentan las especies de *Vibrio* spp es que pueden adquirir la multirresistencia a varios antibióticos de uso clínico y a metales pesados (Zhang *et al.*, 2006). La base genética del origen de la resistencia a diversos compuestos antimicrobianos puede estar mediada por diversos factores entre ellas la presencia de plásmidos, integrones, transposones, mutaciones en genes blanco y la sobreexpresión de bombas de eflujo (Srinivasan *et al.*, 2006); siendo en este caso material de estudio los diversos tipos de integrones en la población de *Vibrio*. Un problema que causa la presencia de dicho material genético (Integrones) es el desarrollo de la multirresistencia a antibióticos pudiendo generar integrones multirresistentes (MRIs), por esta razón los integrones han sido reconocidos como elementos genéticos responsables de la evolución de la multidrogo resistencia en patógenos Gram negativos durante la era antibiótica, así mismo ya son más de 70 los genes de resistencia a antibióticos que fueron caracterizados en integrones (Biskri *et al.*, 2005).

Con la introducción de los antibióticos en los años 40 para el tratamiento de enfermedades infecciosas, la resistencia a antibióticos se ha diseminado dramáticamente entre los microorganismos de origen hospitalario o de origen ambiental. En *V. cholerae*, la ocurrencia de cepas resistentes a drogas está siendo reportada con mayor frecuencia (Bag *et al.*, 1998). La diseminación de la resistencia a drogas en microorganismos ha sido atribuida a la movilización de marcadores de resistencia por una variedad de agentes ya sean plásmidos, transposones o integrones. Los integrones tienen la habilidad para capturar

cassettes génicos de resistencia por lo que su detección y el tipo de resistencia que pueden expresar en sus hospederos, demostraría los posibles riesgos que podría causar a la salud pública, cuando las personas entren en contacto con estos microorganismos y también a la producción acuícola cuando los productos de origen marino estén contaminados con tales agentes potencialmente peligrosos para el hombre.

El presente trabajo de tesis tuvo como principal objetivo determinar y caracterizar los integrones que puedan estar presentes en diferentes cepas de *Vibrio* pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Acuática del Centro de Investigaciones Acuícolas “Alexander Von Humbolt”-IMARPE y aisladas desde el año 2006 al 2008 de muestras de agua de mar procedentes de ambientes marinos del litoral limeño contaminados por la actividad humana.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido evaluar la presencia de los integrones en diferentes ambientes marinos del litoral limeño y además han resaltado la importancia de realizar estudios ecológicos y epidemiológicos en la diseminación de diversas resistencias otorgadas por los integrones u otros factores de patogenicidad.

II. ANTECEDENTES

2.1 GÉNERO *VIBRIO*

Algunos de los microorganismos de este género son patógenos para el ser humano como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y otros menos frecuentes como *V. vulnificus* (Elmor *et al.*, 2007; Bross *et al.*, 2007), *V. mimicus* productor de una hemolisina enterotóxica (Mizuno *et al.*, 2009), *V. metschnikovii* cuyo aislamiento en muestras humanas clínicas es muy rara (Pariente *et al.*, 2008). Presentan dos cromosomas, el caso más estudiado es en *V. cholerae* O1 que presenta un cromosoma grande (ChrI) y otro pequeño (ChrII) (Schoolnik & Yildiz, 2000) (Ver Fig. 1).

2.1.1 IMPORTANCIA DE LOS VIBRIOS EN LA SALUD PÚBLICA

En general, los vibrios no-cholerae pueden causar diversas infecciones, conjuntivitis, gastroenteritis y serias sepsis cuando el humano sufre alguna herida y este a la vez entra en contacto con el agua de mar, otros factores como el consumo de productos marinos, especialmente los mariscos, también propicia la infección al humano (Elmor *et al.*, 2007). De éstos, los patógenos más notables son *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* O139, los cuales son agentes etiológicos de la pandemia conocida como el cólera (Vora *et al.*, 2005; Winn *et al.*, 2008).

2.1.2 IMPORTANCIA DE LOS VIBRIOS EN LA PRODUCCIÓN ACUÍCOLA

Algunas especies de este género afectan también a la producción acuícola produciendo enfermedades llamados necrosis bacilar o necrosis larval afectando los estadios larvales de la mayoría de los moluscos bivalvos de granjas de cultivo. Ésta enfermedad es causada por patógenos oportunistas en las granjas de cultivo intensivo de moluscos, mayormente se asocian con la presencia de *V. tubiashi*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. alginolyticus* y otros *Vibrio* spp. Esta vibriosis puede, aparentemente, presentarse en cualquier proceso en una granja de cultivo y su

presencia se asocia a un inapropiado manejo del mismo (Cáceres & Vásquez, 2003).

2.2 GENOMA DEL GÉNERO *VIBRIO*

El genoma del género *Vibrio* consiste de dos cromosomas circulares. La mayoría de los genes esenciales para la función celular (replicación del DNA, transcripción, traducción y biosíntesis de la pared celular) y patogenicidad (toxinas, antígenos de superficie y adhesinas) están localizados en el cromosoma grande (ChrI). El cromosoma pequeño (ChrII) contiene una gran fracción de genes hipotéticos (59%) comparado con el cromosoma grande (42%), y también contiene muchos más genes cuyo origen podría ser de otras gamma Proteobacteria.

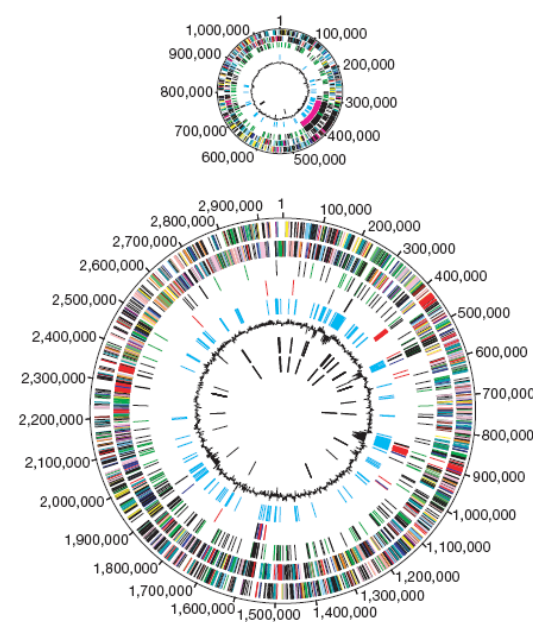


Fig. 1. Representación circular del genoma de *V. cholerae*. Se representan los dos cromosomas, el cromosoma grande y pequeño. Desde el exterior hacia el interior: El primer y segundo círculo muestran las regiones codificadoras de proteínas en la hebra mayor y menor, de acuerdo con el color (proteínas desconocidas e hipotéticas están en negro). El tercer círculo muestra recientemente genes duplicados en el mismo cromosoma (negro) y en cromosomas diferentes (verde). El cuarto círculo muestra un transposón relacionado (negro), relacionados con algún fago (azul), VCRs (rosado) y genes de patogenicidad (rojo). El primer círculo muestra regiones con valor de significancia X^2 para la composición de trinucleótidos en una ventana de 2.000 pb. El sexto círculo muestra el porcentaje de G+C en relación con el sentido de G+C en el cromosoma. El séptimo y octavo son RNAt y RNAr, respectivamente (Heidelberg *et al.*, 2000).

El cromosoma pequeño también porta un sistema de captura de genes (el integrón isla o superintegrón [SI]); este cromosoma podría haber sido un megaplásmido que fue capturado por una especie ancestral de *Vibrio* (Heidelberg *et al.*, 2000; Schoolnik & Yildiz., 2000) (Ver Fig. 1).

2.3 INTEGRONES

Los integrones o elementos de integración fueron descubiertos y caracterizados por primera vez en 1989 por Stokes y Hall como resultado de la evaluación de la multidrogorresistencia a antibióticos clínicos en bacterias, esto debido a la adquisición de diferentes genes insertados en el cromosoma, para esto los autores analizaron las secuencias génicas del transposón *Tn21* y del plásmido R46; tales elementos genéticos de DNA eran desconocidos para ese entonces, proponiendo después el nombre: Elementos de Integración de DNA o simplemente Integrón (Stokes & Hall, 1989). Como también se menciona líneas arriba los estudios iniciales de los integrones se realizaron con plásmidos del grupo de incompatibilidad Inc-W y con transposones relacionados a *Tn21* los cuales poseían genes de resistencia a antibióticos clínicos ubicados en un mismo sitio del genoma, tales genes de resistencia estaban delimitados por secuencias nucleotídicas altamente conservadas, varios de estos genes codificaban enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMA), dihidrofolato reductasas o β -lactamasas del tipo OXA. Los resultados que mostraron los estudios con enzimas de restricción y secuenciación nucleotídica establecieron que las regiones de DNA que flanqueaban estos genes eran muy similares en diferentes plásmidos y transposones (Gonzales *et al.*, 2004).

Así, el integrón es una unidad genética que incluye los componentes determinantes de un sistema de recombinación sitio específico capaz de capturar y movilizar genes que están contenidos en elementos móviles llamados genes *cassettes* (Hall & Collins, 1995), así mismo estos tienen la capacidad de expresar dichos genes que fueron incorporados al sistema convirtiéndolos en genes funcionales. Los componentes esenciales de un integrón incluye el gen de la

integrasa (*intI*), el sitio de unión (*attachment site*) (*attI*) y el promotor, el cual promueve la expresión de algún gen integrado adecuadamente. (Fig. 2). Los integrones son elementos genéticos no móviles pero son un mecanismo importante para la adquisición, reordenamiento y expresión de material genético foráneo o genes *cassettes* de resistencia en la región variable en muchas especies bacterianas (Ceccarelli *et al.*, 2006).

2.3.1 PARTES DE UN INTEGRÓN

El modelo clásico en la estructura de los integrones es tomado de los integrones clase 1 (Ver Figura 2) descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a Bromuro de Etidio y a sulfonamidas. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassettes* genéticos de resistencia.

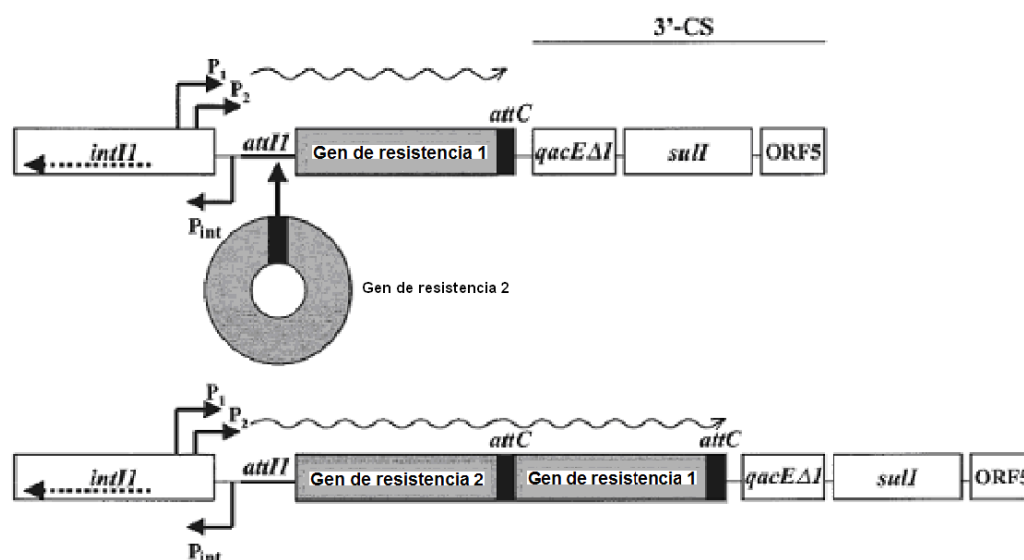


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. El proceso por el cual un gen cassette circularizado (gen de resistencia 2) es insertado en el sitio *attI* en un integrón de clase 1 conteniendo un gen cassette residente (gen de resistencia 1) es lineado en la figura. Los genes y los Marcos Abiertos de Lectura (ORF) en los extremos 5'CS y 3'CS del esquema del integrón de clase 1 son indicados por cajas blancas. Los genes *cassettes* de resistencia insertados en el integrón son indicados por cajas grises y las barras negras verticales representan el sitio de recombinación *attC*. *P₁* y *P₂* son promotores asociados al integrón; *P_{int}* es el promotor del gen de la integrasa (*intI1*). Los genes *qacEΔ1* y *sul1* en el extremo 3'CS confieren resistencia a compuestos amonio cuaternario y sulfonamidas, respectivamente (Carattoli, 2001).

2.3.2 DIFUSIÓN DE LOS INTEGRONES

La transferencia horizontal de genes de resistencia es un mecanismo óptimo para la transmisión y diseminación de la resistencia múltiple a drogas antibacterianas entre patógenos bacterianos. El impacto genético producido por la transferencia horizontal en la evolución bacteriana es particularmente evidente cuando los genes de resistencia están físicamente asociados en *clusters* y transferidos en bloques a las células hospederas. La identificación de estructuras genéticas especializadas, responsables para la adquisición y transporte de genes de resistencia representó un descubrimiento importante para el entendimiento de los mecanismos de resistencia a antibióticos, en este caso, los integrones están implicados en la adquisición de genes de resistencia, tales elementos genéticos están localizados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos; así mismo, la identificación de genes de resistencia -especialmente a antibióticos- en aislados clínicos y veterinarios, especialmente en Gram negativos (particularmente la familia de las *Enterobacteriaceae*) establece la importancia de los integrones en la diseminación de resistencia entre bacterias patógenas de diferentes orígenes geográficos (Caratolli, 2001).

Los integrones por sí mismos no tienen la capacidad de la transferencia horizontal a otros receptores bacterianos, para esto, la difusión de integrones se debe a su asociación con transposones, plásmidos conjugativos o ambos, siendo en éste la conjugación el mecanismo más frecuente de transferencia horizontal de genes, algunos plásmidos no conjugativos pueden ser movilizados *in trans* por la asociación con un plásmido conjugativo, el cual no es normalmente transferido en el mismo momento. En el caso de integrones que forman parte de un transposón, los integrones pueden transportarse desde el cromosoma bacteriano hacia plásmidos y viceversa y en el caso que el integrón esté presente en plásmidos conjugativos, estos pueden transferirse de una bacteria a otra de la misma o de diferente especie, esto es particularmente importante en lo concerniente a la presión selectiva, además que los integrones son una fuente importante de genes

de resistencia a antibióticos, y están presentes tanto en bacterias Gram negativas y positivas (Fluit & Schmitz, 1999; Gonzales *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009).

En relación a los transposones, tales elementos contribuyen a la evolución del genoma bacteriano por la escisión e inserción de fragmentos de DNA de un sitio donador, a otros sitios blancos no homólogos. Los transposones son elementos genéticos móviles que codifican la maquinaria necesaria para promover la auto-translocación (por ejemplo, la transposasa y los sitios de recombinación de DNA en el que la recombinasa actúa). Algunos transposones son conocidos por contribuir a la movilidad del integrón. Los integrones de clase 1 y 2 son frecuentemente transportados por los elementos de transposición Tn21 y Tn7, respectivamente. Además, se han identificado algunos integrones en las proximidades o yuxtapuestas con las secuencias de inserción (IS).

Es evidente que la asociación entre un sistema eficaz de captura y expresión de genes, junto con la capacidad de movilidad vertical y horizontal, representa una combinación importante en el flujo natural de genes de resistencia. Por otra parte, los integrones llevados por transposones han sido descritos preferentemente incorporados en un plásmido conjugativo, el cual garantiza una amplia transferencia horizontal de genes de resistencia (Caratolli, 2001).

2.3.3 INTEGRASA

La integrasa (*IntI*) es un miembro de la familia tirosina recombinasa sitio-específico, el cual también incluye a la integrasa del fago λ . Estas enzimas catalizan la escisión e integración de unidades de DNA, realizando pasos o etapas de cortes y reagrupación de los mismos, estos pasos se dan sin la síntesis de DNA o la intervención de cofactores de alta energía (tal como ATP). La integrasa es la responsable para la recombinación sitio específica de genes *cassettes* a la región variable del integrón, reconociendo las secuencias *attI* del *cassette* y *attC* de la región variable, respectivamente. Esta característica diferencia a la recombinación sitio-específica de la transposición, en la que este último precisa de un paso para la reparación y síntesis de DNA. La integrasa no es una nucleasa y

su actividad puede ser asimilada a la de una topoisomerasa (Carattoli, 2001; Lewin, 2004; Joss *et al.*, 2009).

2.3.4 GENES CASSETTES Y ELEMENTOS 59 pb (SITIO *attC*)

Los genes *cassettes* son un grupo diverso de pequeños elementos génicos móviles que usualmente contienen sólo un gen y un sitio de recombinación río abajo actualmente conocido como sitio *attC* (elemento de 59 pb) localizado en el extremo 3' del *cassette* que permite el reconocimiento y movilización de los mismos, además son uno de los elementos móviles más simples ya conocidos. Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas de DNA circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el *cassette* desde un integrón aunque normalmente son encontradas asociadas con estos (Collis *et al.*, 1993; Partridge *et al.*, 2000).

Cada uno de estos genes *cassettes* están asociados en el extremo 3' con un elemento 59 pb particular, el cual difiere en secuencia y longitud aunque estos elementos son identificables a partir de estructuras comunes y secundarias. El sitio *attC* consiste de una larga secuencia repetitiva invertida de longitud variable formadora de una estructura cruciforme imperfecta, el cual es flanqueado por secuencias inversas y *forward* (RYYAAC es el consenso para la secuencia inversa y GTTRRRY es el consenso para la secuencia *forward*).

La falta de promotor en los genes *cassettes* delante de la secuencia codificante implica que el promotor localizado en el 5'CS del integrón es esencial para la expresión de los genes *cassettes*. En el extremo 5'-CS de los integrones de clase 1 tiene dos potenciales promotores, P₁ y P₂ (Fig. 2). Una aparente polarización de expresión existe para estos promotores (P₁ y P₂), pues el más alto nivel de expresión es obtenido para el primer gen *cassette* que está localizado directamente río abajo del promotor, en cambio, los genes *cassettes* distantes del promotor son débilmente expresados debido a la prematura terminación de la transcripción ocurrido entre el elemento 59 pb de los genes *cassettes* procedentes.

Los genes *cassettes* son considerados como elementos móviles pero estos no pueden codificar productos que impliquen su propia movilidad, así mismo los genes *cassettes* permanecen libres como moléculas circularmente cerradas generadas por escisión mediada por la integrasa en *cassettes* previamente integrados del mismo o de otro integrón.

Los genes *cassettes* llevados por los integrones confieren resistencia a varios antibióticos como aminoglicósidos, cefalosporinas, cloramfenicol, penicilinas y trimethoprim, y para cada uno de estas clases de antibióticos varios genes *cassettes* distintos han sido reportados; también se reportó genes *cassettes* que codifican β -lactamasas de espectro extendido o carbapenemasas (*bla*_{IMP}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{VIM}). Una lista de 15 genes diferentes que codifican aminoglicósido-adeniltransferasas (*aad*) o aminoglicósido-acetiltransferasas (*aac*) confiriendo resistencia hacia los aminoglicósidos, han sido identificados como genes *cassettes* en los integrones. La resistencia a cloramfenicol es frecuentemente dado por los genes cloramfenicol acetiltransferasa tipo B (*catB*) o por los genes que codifican uno de las tres bombas de eflujo conocidos (*cmf*). Los genes de resistencia a rifampicina (*arr-2*) y eritromicina (*ereA*) han sido también descritos como genes *cassettes* en los integrones. Una lista de seis ORFs de función desconocida también fueron descritos (Caratolli, 2001).

2.3.5 INSERCIÓN Y EXPRESIÓN DEL CASSETTE GÉNICO

La inserción específica de sitio de los *cassettes* genéticos a la región variable de los integrones ha sido detectada solamente en las células que expresan la actividad de la integrasa, indicando que esta enzima recombinasa es necesaria para la integración de los genes *cassettes*, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón. La integrasa interactúa con los dos sitios primarios de recombinación, el sitio *attI* de los integrones y el sitio *attC* de cada *cassette* genético. Por otra parte, la especificidad de la orientación de los *cassettes* genéticos integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5'CS de los integrones, cuya secuencia nucleotídica es altamente

conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando incluso a niveles tan bajos de expresión que la bacteria aparece fenotípicamente susceptible al antibiótico clínico probado aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia (Gonzales *et al.*, 2004).

2.3.6 PARTICIPACIÓN DEL PROMOTOR EN LA EXPRESIÓN DEL CASSETTE

El nivel de resistencia a un determinado inhibidor microbiano, codificado por un gen *cassette* de resistencia, depende también de su posición en la región variable del integrón, cuando está presente más de un gen *cassette*, ya que la posición de este gen en el rearrreglo genético influencia el nivel de resistencia hacia antimicrobianos, ya sea más cercana o lejana del promotor común. Las bacterias manifiestan niveles de resistencia más elevados cuando el gen de resistencia está ubicado como primer gen *cassette*, es decir, cuando dicho *cassette* está muy cercano al promotor y tales niveles de resistencia se reducen a medida que los genes están en *cassettes* posteriores, en el lado río abajo del promotor (Collis & Hall, 1995).

2.3.7 FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL INTEGRÓN

La función principal del integrón es la captura de genes *cassettes* (DNA foráneo) por recombinación específica de sitio debido a la actividad de la Integrasa (*intI*). Esta enzima captura genes foráneos que son frecuentemente insertados por la actividad de recombinación en el *attachment site* (*attI*) del integrón. Este evento de captura e inserción de DNA foráneo puede ocurrir varias veces y, en el caso de algunos integrones ubicados en el cromosoma, este proceso puede llevar a la creación de grandes *arrays* que codifican múltiples genes *cassettes*. Esta característica de capturar genes y ligarlos en el genoma en *arrays* adecuados para la co-expresión es una cualidad única para este elemento genético. El resultado es un conjunto de genes que interactúan funcionalmente, teóricamente facilitando la rápida evolución de nuevos fenotipos microbianos. Inicialmente, los integrones fueron considerados como la mayoría de elementos especializados que participan

en la acumulación de genes *cassettes* codificando la resistencia a antibióticos en bacterias patogénicas (Gonzales *et al.*, 2004).

La aparición de genomas y la disponibilidad de numerosas secuencias genómicas de bacterias ambientales hace claro que el integrón es el sistema capturador de genes más antiguo y expandido, además que este elemento genético es encontrado en un 10% de todas los genomas secuenciados y que los *cassettes* pueden llegar a tener un tamaño de 150 Kb, pocos integrones han sido debidamente identificados y anotados como tal. Aún cuando el gen de la integrasa es resaltado debido a su similitud a homólogos caracterizados, los genes *cassettes* asociados con la enzima están marcados como simples marcos abiertos de lectura (ORFs), esto es, porque en los sitios *attC* la característica más distintiva de los genes *cassettes*, son regiones no codificantes (Joss *et al.*, 2009).

2.3.8 TIPOS DE INTEGRONES

Se han descrito varias clases de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen de la integrasa (*intl*), las de clase 1, 2 y 3 son llamadas integrones de multirresistencia. Las integrasas presentan entre 45% y 58% de homología aminoacídica, lo que da a entender que hubo una divergencia evolutiva por un período superior a 50 años, correspondiendo aproximadamente con la era antibiótica y por lo tanto implicados con la diseminación de la multidrogorresistencia. Se han encontrado integrones de las clases 1 y 2 en plásmidos y transposones, en tanto aquellos de clase 3 sólo han sido observados en plásmidos. Otro tipo de integrón llamado inicialmente integrón isla, integrón de clase 4 y actualmente llamado “Superintegrón (SI)”, fue identificado inicialmente en *V. cholerae* O1 pero también fue encontrado en otros miembros de la familia Vibrionaceae. Este superintegrón contiene 179 genes *cassettes* en una región de 126 Kb, correspondiendo al 3% del total del genoma (Gonzales *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006).

Como se menciona líneas arriba, cuatro clases de integrones han sido definidos basado a la homología de la integrasa:

2.3.8.1 Integrones de Clase 1

Esta representa la estructura más común de los elementos pertenecientes a esta clase y están caracterizados por la presencia de dos segmentos conservados, el segmento conservado 5' (5'CS) y el segmento conservado 3' (3'CS). El 5'CS contiene el gen *intl*, el sitio *attI* y el promotor, mientras que el 3'CS codifica para el gen *sul1*, confiriendo resistencia a sulfonamidas y el gen *qacEΔ1*, confiriendo resistencia a compuestos amonios cuaternarios usados como desinfectantes, además que el 3'-CS lleva el ORF5 que codifica a una proteína de función desconocida (Paulsen *et al.*, 1993; Gonzales *et al.*, 2004) (Ver Fig. 2).

Las otras clases de integrones relacionados con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o delección de algunos genes o secuencias de inserción (Gonzales *et al.*, 2004).

2.3.8.2 Integrones de clase 2

El integrón de clase 2 es encontrado en la familia del transposón *Tn7*, el gen *intl2* (localizado en el 5'CS) tiene un codón stop interno y por esto conocido como una integrasa defectuosa, la cual es conservada entre los genes *intl2* en otros tres transposones similares al *Tn7* portando los genes *cassettes dfr1-sat-aadA1*. La secuencia peptídica del *intl2* es de 325 aminoácidos y es 46% idéntico al *intl1*. Las secuencias flanqueantes de los *cassettes arrays* en los integrones de clase 1 y 2 no están cercanamente relacionados, el sitio *attI2 Tn7* está localizado entre el gen *intl2* y el primer gen de resistencia insertado como también es descrito para los integrones de clase 1. Los integrones de clase 2 no contienen el gen *sul1* pero este incluye genes cuyas funciones promueve la transposición de *Tn7* (Hansson *et al.*, 2002). La estructura de este integrón se muestra en la figura 3.

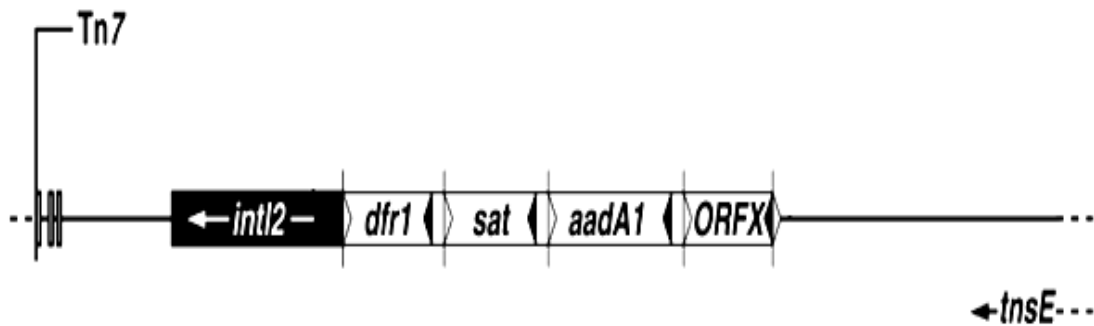


Fig. 3. Estructura del integrón de clase 2 en Tn7. La secuencia del integrón está representada por cajas. La caja negra muestra el gen *intI2*, los genes *cassettes dfr1-sat-aadA1* son mostradas en las cajas blancas (Hansson *et al.*, 2002).

2.3.8.3 Integrones de clase 3

Hallados en *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* y *Klebsiella pneumoniae* aislados de Japón (Fluit & Schmitz, 2004), es una estructura de 2,863 bp y consiste de un gen de la integrasa *intI3*, un sitio de recombinación *attI3*, dos regiones promotoras, y dos genes *cassettes*, el gen *cassette bla_{GES-1}* y un gen *cassette* que resulta de la fusión del *bla_{OXA}* tipo 10 y el *aac(6')-Ib* que confiere resistencia a kanamicina, dicha estructura se puede apreciar en la figura 4 (Correia *et al.*, 2003). El gen de la integrasa (*intI3*) muestra una identidad del 60.9% comparado con el gen *intI1* a nivel aminoacídico (Carattoli, 2001).

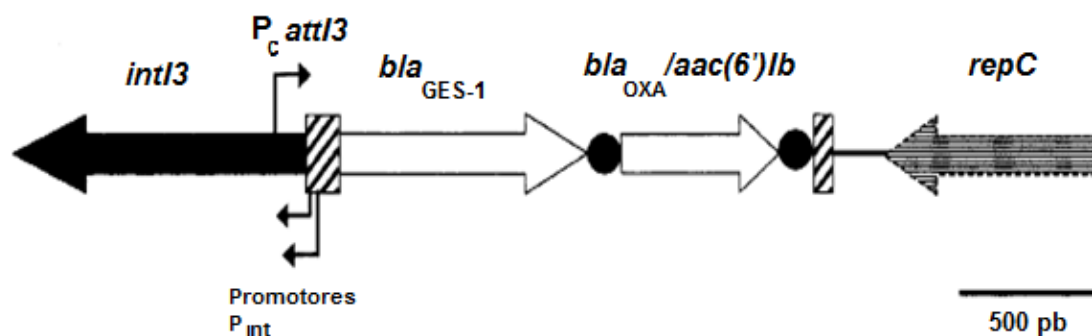


Fig. 4. Representación esquemática del integrón de clase 3 In3-p22K9 y sus regiones flanqueantes en el plásmido p22K9. Los marcos abiertos de lectura (ORF) están indicadas por flechas y los elementos de 59 pb son representados por círculos negros (Correia *et al.*, 2003).

2.3.8.4 Integrones de clase 4 o Superintegrón (SI)

Una cuarta clase de integrón que porta cientos de genes *cassettes* y están asociados con el gen de la integrasa *intI4*, es encontrado mayormente en el cromosoma pequeño de *V. cholerae*, en este cromosoma se descubrió que contiene un “integrón isla” que consiste de secuencias repetitivas agrupadas “*Vibrio cholerae repeat*” (VCRs) separadas en muchos casos por un sólo ORF, organizado por una vía similar a los genes *cassettes* llevados por el integrón. Genes potenciales para la virulencia como la hemaglutinina manosa resistente han sido identificados como genes *cassettes* ligados a VCRs en los superintegrones de *V. cholerae* (Carattoli, 2001). Hay reportes que describe que hay nueve VCRs asociados con un locus que determina la hemaglutinación resistente a la manosa y fucosa (Barker *et al.*, 1994; Franzon *et al.*, 1993, Clark *et al.*, 1997). En relación a los VCRs, estas secuencias son altamente conservados, entre un 95-97% de identidad, así como los elementos 59 pb, muchos de los VCRs están flanqueados por la secuencia consenso RYYAAC y GTTRRY (R=Purina, Y=Pirimidina); estas secuencias están asociadas con los sitios de recombinación. (Clark *et al.*, 1997).

Este superintegrón forma una estructura compleja y puede constituir una gran isla de patogenicidad en el genoma de *V. cholerae*, así mismo esta estructura se encontró en cepas de *Vibrio* aisladas en el año 1888 y anterior a la era antibiótica, por esto se sugirió que el *IntI4* podría ser el ancestro de las demás integrasas, el cual podría haberse adaptado para adquirir genes de resistencia a antibióticos en el pasado más reciente. Esta hipótesis confirmaría que los integrones, aparte de cumplir un rol importante en la aceleración de la evolución bacteriana en la resistencia a antibióticos, también podrían diseminar genes de virulencia contribuyendo por lo tanto a la evolución de la virulencia bacteriana (Carattoli, 2001).

Este superintegrón ha sido descrito también en varios géneros bacterianos: *Geobacter sulfurreducens*, *Listonella pelagia*, *Nitrosomonas europaea*,

Pseudomonas alcaligenes, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella oneidensis*, *Shewanella putrefaciens*, *Treponema denticola*, *Xanthomonas campestris*; entre las especies del género *Vibrio*: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fischerii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* (Fluit & Schmitz, 2004).

Este superintegrón está localizado en el cromosoma 2 (125.3 kbp). Todos los SI contienen varias copias VCR y unos 216 ORFs; así mismo muchos de estos ORFs no tienen homología con otras secuencias. Algunos genes reconocibles implicados con la resistencia a drogas se encuentran: la cloramfenicol acetiltransferasa, proteína resistente a fosfomicina y glutatión transferasa; varias enzimas que participan en el metabolismo de DNA (gen relacionado a la familia de proteínas *MutT*, transposasa *OrfAB*, Secuencias de inserción *IS5*, y una integrasa), genes potenciales de virulencia (hemaglutininas y lipoproteínas) y tres genes que codifican productos génicos similares a las proteínas de adhesión al hospedero (*higA*, *higB* y *doc*), los cuales son usados por plásmidos para su mantenimiento en las células hospederas (Heidelberg *et al.* 2000); genes *qnr* y la dehidrofolato reductasa (*dfr6*), los cuales otorgan resistencia a ciprofloxacina y al trimetoprim respectivamente (Fonseca *et al.*, 2008; Kumar & Thomas, 2009).

2.4 INTEGRONES EN AMBIENTES NATURALES

Estas estructuras genéticas movilizables, dado que si bien no son esenciales para la sobrevivencia en las bacterias, aportan genes adicionales que les permiten una mejor adaptación a ambientes hostiles. Estos elementos fueron encontrados en bacterias recuperadas de ambientes naturales así como en el género *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Shewanella*, *E. coli* entre otros; aunque estos elementos genéticos de integración es más común encontrar en microorganismos provenientes de aislados clínicos. Existen numerosos estudios y publicaciones que documentan el hallazgo de integrones provenientes de aislamientos obtenidos en ambientes naturales como ríos, lagos, suelos, mares y otros lugares sin conocida exposición a antibióticos (Ozgumuz *et al.*, 2007; Taviani

et al., 2008; Bakhshi *et al.*, 2009; Laroche *et al.*, 2009, Di Conza & Gutkind, 2010). Un trabajo realizado por Rosser & Young (1999) con bacterias Gram negativas aisladas de estuarios y en ausencia de presión selectiva continua (entorno acuático) mostró que el 3,6% de las cepas mostró tener el integrón de clase 1. Además, Nemergut *et al.* (2004), reportaron la presencia y diversidad de integrones y genes transferidos por estos en comunidades microbianas presentes en relaves mineros contaminados con metales pesados, descubriendo 14 genes no reportados para la integrasa, incluyendo 6 líneas de genes nuevos, también encontraron 11 *cassettes* nuevos, donde la secuencia de uno de ellos fue similar a un gen que codifica una proteína para la ruta del catabolismo de nitroaromáticos, presente en los relaves lo cual sugiere que los integrones son importantes para la transferencia de genes en respuesta a una presión selectiva diferente a la de los antibióticos.

2.5 Vibrios e integrones en el medio ambiente marino

En relación a la presencia de integrones sólo en cepas de *Vibrio* de origen marino, no hay muchos reportes que traten sobre este tema pues la mayoría de trabajos reportados para este género se remonta mayormente a aislados de ambientes hospitalarios. La presencia de este material genético se hace notar más por la presencia del superintegrón y el integrón de clase 1, siendo mayormente este último el que contribuye en parte a la expresión de la resistencia a los antibióticos (Chen *et al.*, 2003; Taviani *et al.*, 2008; Bakhshi *et al.*, 2009; Le Roux *et al.*, 2009).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Los ambientes marinos de la costa limeña son impactados por la contaminación producida por la actividad humana, la cual introduce microorganismos patógenos y potencialmente patógenos para el hombre al ecosistema acuático marino, favoreciendo de esta manera la persistencia de elementos genéticos como los integrones, ya sea en plásmidos o en el mismo cromosoma bacteriano, asociados con la virulencia de estos microorganismos. Las diferentes especies del género *Vibrio*, si bien forman parte de la flora autóctona marina, exhiben resistencia a diversos agentes antimicrobianos, la cual puede estar asociada a integrones y constituir un riesgo de salud pública desde el momento en que estas bacterias se asocian a especies hidrobiológicas consumidas por el hombre, afectando además la balneabilidad de las playas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar y caracterizar los integrones presentes en cepas de *Vibrio* spp aisladas de ambientes marinos de la costa limeña.
- Relacionar la presencia de integrones con la resistencia a drogas en las cepas estudiadas.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar las cepas en estudio a nivel de especie.
- Determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia a antibióticos de las cepas en estudio.
- Identificar y caracterizar los integrones de clase 1, 2, 3 y el superintegrón.

- Relacionar la presencia de integrones con la resistencia a antibióticos de uso clínico.
- Identificar genes *cassettes* asociados a los integrones hallados.
- Analizar las secuencias de las integrasas encontradas.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *Vibrio* spp evaluadas en este estudio, pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Acuática del Centro de Investigaciones Acuícolas “Alexander Von Humbolt”-IMARPE, y fueron aisladas de muestras de agua de mar recolectadas de diferentes puntos de monitoreo del litoral limeño entre los años 2006 y 2008 (Ver figura 4), -todas las muestras fueron aguas superficiales- la ubicación de dichos puntos de monitoreo se muestran en el anexo 1. Algunas estaban guardadas en stock y otras fueron aisladas para este proyecto durante el año 2008.

4.1.1 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS EN STOCK

Las cepas se reactivaron en caldo TSB suplementado con 2-3% de NaCl por 18-24 horas a temperatura ambiente. Se sembró una alícuota de cada cultivo por el método de estriado, en placas con Agar TCBS (Tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa). Se seleccionó de cada placa, una colonia sacarosa positiva y/o sacarosa negativas de manera que se asegure la pureza de las cepas.

4.1.2 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de agua de mar fueron recolectadas entre los meses de abril a octubre de 2008, el organigrama de aislamiento de las cepas se muestra en el anexo 2.

Para el recojo de las muestras se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL previamente esterilizados, siguiendo el método descrito por Eaton *et al.* (2005).

4.1.2.1 Transporte y procesamiento de la muestra

Los frascos con las muestras de agua fueron almacenados en un contenedor térmico con refrigerantes por un par de horas hasta su procesamiento.

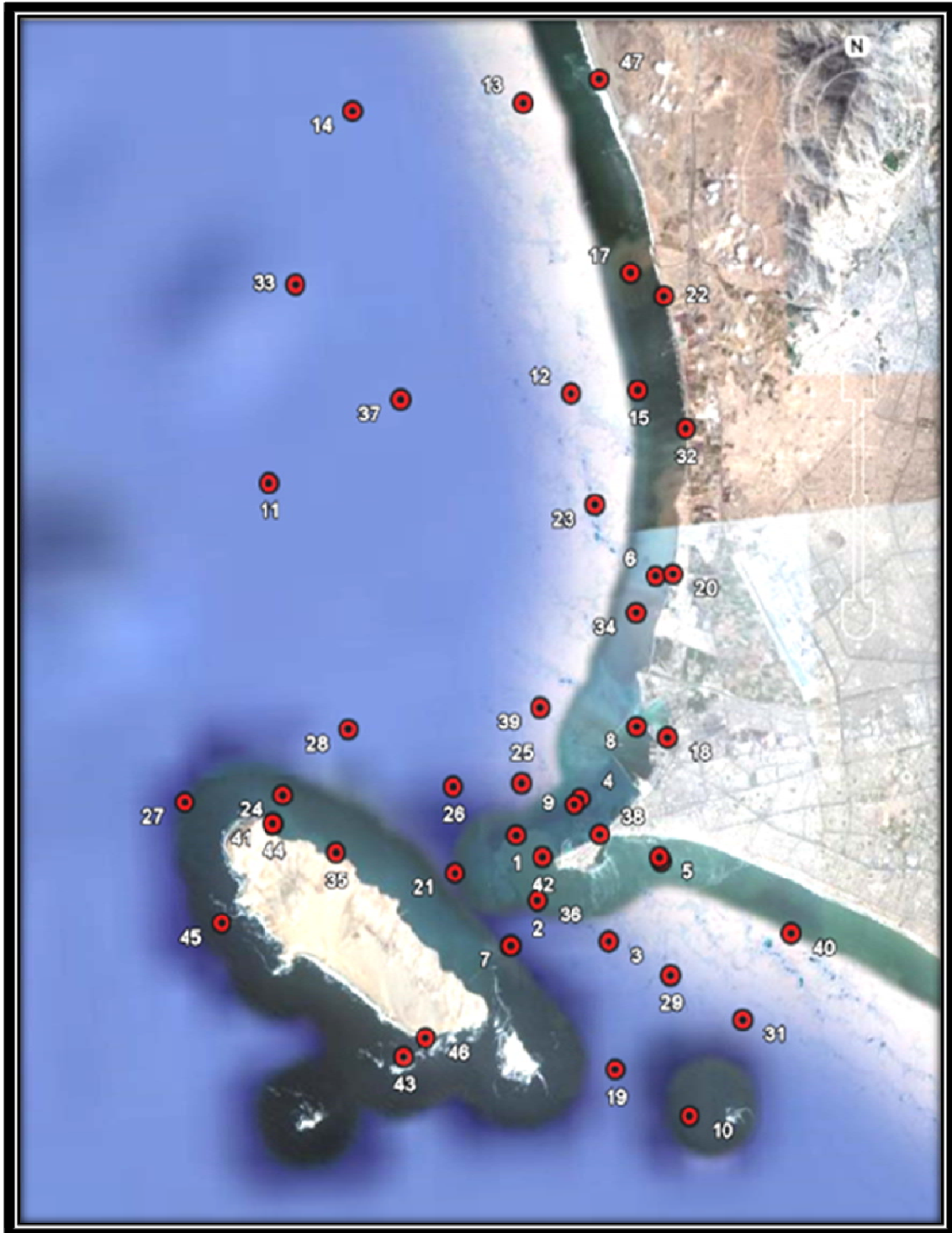


Fig. 5. Puntos de monitoreo de donde fueron colectadas las muestras de agua para el aislamiento de los *Vibrios*.

4.1.2.2 Aislamiento de *Vibrio*

El aislamiento de *Vibrio* se realizó siguiendo las técnicas reportadas según Caffer *et al.*, 2007.

4.1.2.3 Enriquecimiento selectivo

Se realizó un enriquecimiento selectivo de las muestras, sembrando volúmenes iguales de Agua Peptonada Alcalina (APA) 2X (pH 8,5) y agua de mar. Se incubó a temperatura ambiente por 24 horas.

4.1.2.4 Aislamiento de las cepas

Se cogió una alícuota del cultivo en medio APA y se sembró por el método de estriado en placas con Agar TCBS. Se incubó a temperatura ambiente por 18-24 horas.

4.1.2.5 Selección de las colonias

Del Agar TCBS, se procedió a aislar colonias circulares de diversos diámetros, amarillas (sacarosa positiva) y/o verdes (sacarosa negativa), característico de las especies de *Vibrio*.

Las colonias aisladas se sembraron en frascos con Agar TSA complementado con CINA 2% (pH 8,0 \pm 0,4), utilizados para cepario hasta su posterior análisis de identificación y molecular.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

4.2.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES

Se realizó la identificación por bioquímica tradicional según Llop *et al.*, 2001 (sacarosa, oxidasa, Lisina, ornitina, lactosa, indol, manitol, Cloruro de Sodio al 0, 1, 6, 7 y 10%) a 170 cepas de *Vibrio*, se consideró que las reacciones fueron positivas o negativas hasta 48 horas de incubación a 35 ó 37 °C; en algunas

cepas se realizó la identificación por API 20 NE, éstas por no presentar las características culturales esperadas en las pruebas bioquímicas convencionales.

4.2.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA CON EL SISTEMA API 20 NE

4.2.1.1 Preparación de la galería o cámara de incubación

Se reunió la tapa con el fondo de la cámara de incubación y se procedió a colocar agua destilada estéril en los pocillos encontrados en la base, esto con el fin de crear una atmósfera húmeda.

4.2.1.2 Preparación del inóculo

Se cogieron de tres o cuatro colonias de cada cepa -sembradas previamente en agar TCBS- y se suspendió en solución salina (1% CNa) hasta alcanzar la turbidez de 0,5 de la Escala de McFarland.

4.2.1.3 Inoculación de la suspensión en la galería

Se rellenaron los pocillos (y no las cúpulas) de los ensayos desde NO_3 (Nitrato) hasta PNPG (4-nitrofenil- β D-galactopiranosida), evitando la formación de burbujas.

Se cogió 200 μL de la suspensión y se transfirió a una ampolla con Medio API AUX, homogenizándolo. Con esto se rellenó los pocillos faltantes, desde el Glu (D-glucosa) hasta PAC (Ácido fenilacético). Se rellenó con aceite mineral a tres pocillos que contenían: D-glucosa, L-triptófano y L-arginina para generar la anaerobiosis.

La cámara se incubó a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (± 2 horas).

4.2.1.4 Lectura e interpretación del API 20 NE

Después de la incubación, la lectura se realizó comparando los resultados con la Tabla de Identificación para API 20 NE.

La lectura para el ensayo de NO_3 se realizó añadiendo una gota del reactivo NIT1 y NIT2; para el ensayo TRP, se añadió una gota del reactivo JAMES para los

ensayos de asimilación (D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetyl-glucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato trisódico, ácido fenilacético); se observó la presencia o ausencia de turbidez.

4.2.1.5 Identificación de la cepa de *Vibrio* L22 por PCR

La identificación de la cepa de *Vibrio* L22 se realizó mediante PCR, porque ésta presentó el gen *intI4* del superintegrón, dicha prueba se realizó tomando los iniciadores 27f y 536r. Las condiciones del PCR se detallan en la Tabla 1.

4.3 Determinación de la resistencia a antimicrobianos clínicos

4.3.1 DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PROBADOS.

Todos los discos de antimicrobianos de uso clínico y la concentración de éstos utilizados en el presente estudio fueron: Cloramfenicol (C), 30 µg; Norfloxacin (Nor), 10 µg; Amikacina (Ak), 30 µg; Kanamicina (K), 30 µg; Ampicilina (A), 10 µg; Penicilina (P), ; Tetraciclina (Te), 30 µg; Aztreonam (Az), 30 µg; Ceftazidima (Caz), 30 µg; Gentamicina (Ge), 10 µg; Amoxicilina (Amx), 25 µg; Nitrofurantoína (Nit),; Cotrimoxazol (Sxt), 25 µg; Ácido Nalidíxico (W), 30 µg y Ciprofloxacina (Cip), 5 µg. Todos fueron de la marca Oxoid. Previamente se comprobó la calidad de los antibióticos frente a la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Se realizó la prueba de susceptibilidad a la fosfomicina (50 µg), sólo a la cepa de *Vibrio* L22, porque ésta presentó el gen *intI4* del superintegrón y hay reportes que éste codifica la resistencia a dicho antibiótico.

4.3.2 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA MICROBIANA

La sensibilidad y la lectura de la resistencia microbiana en las cepas de estudio, se realizó siguiendo el método de disco difusión en placa con agar Müller Hinton (Sacsquispe & Velásquez, 2002).

Las cepas reaisladas del agar TCBS fueron cultivados en caldo LB 1% NaCl a temperatura ambiente hasta alcanzar la turbidez del 0,5 de la escala de Mc Farland ($1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922). Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión presionándolo por las paredes del tubo para eliminar el exceso del inóculo, inoculando sobre la superficie seca de la placa con agar Müller Hinton (1% NaCl), se estrió el hisopo en tres direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente por unos minutos para que el exceso de humedad sea absorbida, los discos se colocaron sobre la superficie del agar con ayuda de una aguja estéril, presionando sobre cada disco para asegurar el contacto completo con la superficie del agar. Las placas se incubaron a 35 °C por 16-18.

4.3.3 LECTURA Y ANÁLISIS DEL ANTIBIOGRAMA

Para la lectura del antibiograma, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) usando una regla milimetrada. El tamaño de los halos fueron comparados con la tabla de: Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (Sacaquispe y Velásquez, 2002); e interpretados como sensible, intermedia o resistente.

4.4 EXTRACCIÓN DEL DNA

4.4.1 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS

Las cepas de *Vibrio* spp se cultivaron en Caldo TSB 2% NaCl por 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se cogió 1,5 mL del cultivo joven y se depositó en tubos para microcentrífuga, centrifugándolo a $13000 \times g$ por 3 min para sedimentar las células. Se removió el sobrenadante dejando el precipitado bacteriano lo más seco posible.

4.4.2 LISIS DE LAS CÉLULAS

Para el lisado de las cepas se agregó una solución de 200 µL de la resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, SIGMA) 5% (De Lambellerie *et al.*, 1992) al precipitado bacteriano, homogenizando el precipitado con el Chelex en un vortex y se llevó a Baño María a 100 °C por 6 - 7 min para lisar las células

4.4.3 RECUPERACIÓN DEL DNA

Después del Baño María se centrifugaron los tubos de microcentrífuga a 13000 x g por 5 min, recuperando el DNA. Se cogió 100 µL del sobrenadante y se depositó en un tubo nuevo almacenándolo a -20 °C hasta su utilización para las pruebas de PCR.

4.4.4 AISLAMIENTO DEL CROMOSOMA 2

Se realizó el aislamiento del cromosoma 2 para confirmar si el integrón se encontraba en el cromosoma 1 o cromosoma 2.

4.4.4.1 Preparación de las células.

1. Se preparó 4 mL de caldo TSB suplementado con NaCl 2%, inoculando 40 µL de un cultivo inicial de la cepa de *Vibrio* e incubados a temperatura ambiente por 24 horas.
2. Se colocó 1,5 mL del cultivo a un tubo de microcentrífuga, centrifugándolo a 13000 x g por 3 min para sedimentar las células.
3. Se removió el sobrenadante por aspiración, dejando el pellet bacteriano lo más seco posible.

4.4.4.2 Lisis de las células.

4. Se resuspendió el pellet bacteriano con 100 µL de solución para lisis alcalina l fría con agitación vigorosa.

5. Se agregó 200 μ L de solución para lisis alcalina II a la suspensión bacteriana, cerrando fuertemente el tubo y homogenizando el contenido invirtiendo el tubo 10-15 veces (rápidamente), incubándolo a temperatura ambiente por 5 min.
6. Se agregó 150 μ L de solución para lisis alcalina III, se cerró fuertemente el tubo y se homogenizó con el lisado bacteriano invirtiendo el tubo varias veces, incubando el tubo en frío a temperatura ambiente por 3-5 min.
7. Se centrifugó el lisado bacteriano a 13000 x g por 10 min en una microcentrífuga.
8. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta a un tubo nuevo.

4.4.4.3 Recuperación del cromosoma 2

9. Se precipitaron los ácidos nucleicos del sobrenadante agregando dos volúmenes de etanol puro a temperatura ambiente, homogenizando la solución con vortex y dejando después el tubo en posición vertical por 5 min a temperatura ambiente.
10. Se colectaron los ácidos nucleicos precipitándolo por centrifugación a 13000 x g por 10 min en una microcentrífuga.
11. Se removi6 cuidadosamente el sobrenadante por aspiración dejando después el tubo en posición invertida sobre un papel secante para permitir que los fluidos se sequen.
12. Se agregó 1 mL de etanol 70% al precipitado y se homogenizó suavemente, recuperando el DNA por centrifugación a 13000 x g por 10 min, removiendo todo el sobrenadante por aspiración, dejando el tubo abierto a temperatura ambiente por 10-15 min hasta que el etanol se evapore y no se observe algún fluido.

13. Se disolvió los ácidos nucleicos con 50 µL de agua ultra pura libre de nucleasas, se agitó la solución suavemente con un vortex por pocos segundos, almacenándolo a -20 °C hasta su utilización.

4.5 DISEÑO DE INICIADORES PARA PCR

Las secuencias de los iniciadores usados en este trabajo se muestran en la tabla 1. Los iniciadores se diseñaron para la amplificación de una porción de la integrasa, *16S* y demás genes relacionados a los integrones, la secuencia de algunos iniciadores fueron obtenidos de artículos publicados y otros fueron diseñados usando los programas Primer3 Input (versión 0.4.0) y el Primer SeqBuilder (LaserGen); la especificidad de los mismos se verificó con las secuencias génicas obtenidas del *GenBank*, realizando el BLAST de nucleótidos.

En relación al diseño de los iniciadores VCR-F, VCR7-F y Vcr2-R-*transposase* se basó tomando las secuencias de los VCRs almacenados en el *Genbank* o de secuencias reportadas en las referencias, ya que estos tienen una similaridad entre el 95 - 97%, lo que hace difícil el diseño de iniciadores específicos, se optó por diseñar iniciadores en relación del tipo de VCR que está asociado a los genes *cassettes* de interés en este estudio.

4.6 AMPLIFICACIÓN DE LA INTEGRASA, 16S Y GENES DEL SUPERINTEGRÓN POR PCR

4.6.1 PRIMERS O INICIADORES

Para la amplificación del gen de la integrasa (*intl*), *16S* y genes de función metabólica o de virulencia reportados al superintegrón, se utilizaron los iniciadores mencionados en la tabla 1. Se estandarizaron las condiciones del PCR, siguiendo las instrucciones provistas para la *Taq* polimerasa comercial y de las condiciones que requieran los iniciadores utilizados y el tamaño esperado del fragmento a amplificar.

4.6.2 MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un Termociclador para PCR (ThermoCycler MJ Research), se preparó una mezcla de reacción conteniendo 20 pmol de cada iniciador o *primer*, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen), Buffer 1 X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4, 50 mM KCl)] para la PCR; de la mezcla se tomaron 24 µL para depositarlo en tubos Eppendorf para PCR.

4.6.3 CONDICIONES DE LA PCR

Las condiciones de la PCR para la amplificación de los genes se muestran en la Tabla 1.

4.7 CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE FUNCIÓN METABÓLICA O DE VIRULENCIA REPORTADOS PARA EL SUPERINTEGRÓN

Se diseñaron iniciadores para la confirmación de la presencia de genes asociados al superintegrón, los iniciadores VCR-F, VCR7-F y Vcr2-R-transposase fueron diseñados para confirmar que los genes *cassettes* encontrados están ubicados en el superintegrón (Ver Tabla 1).

4.8 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para la visualización de los productos del PCR, se tomaron 3 µL de Buffer carga y 7 µL del producto amplificado, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1% en Buffer TAE 1 X a 80 mV por 60 min, el gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL) por 10 min, las bandas se visualizaron en un transiluminador y luego fue fotografiado. Para observar el peso molecular de la amplificación se comparó con el marcador *MassRuller DNA Ladder* (Fermentas).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de las integrasas y condiciones de la PCR para la amplificación.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>	Gen blanco	Condiciones del PCR			Tamaño (pb)
			Denaturación	Alineamiento	Amplificación	
INT-IU	GTTCGGTCAAGGTTCTG	<i>intl1</i>	94 °C, 60 s	58 °C, 60 s	72 °C, 60 s	923
INT-ID	GCCAACTTTCAGCACATG					
inti2F	GCAAATGAAGTGCAACGC	<i>intl2</i>	94 °C, 60 s	53 °C, 60 s	72 °C, 60 s	467
inti2R	ACACGCTTGCTAACGATG					
Inti3F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	<i>intl3</i>	94 °C, 60 s	62 °C, 60 s	72 °C, 60 s	600
Inti3R	TGTTCTTGATCGGCAGGTG					
INT-4U	GTGTTGCGCAATTTATGC	<i>intl4</i>	94 °C, 60 s	56 °C, 60 s	72 °C, 60 s	936
INT-4D	ACGGGATAATGGGCTTAA					
mrhF	GAAGAGTTGTTTCGTGAAGT	<i>mrhB</i>	94 °C, 60 s	52 °C, 60 s	72 °C, 30 s	173
mrhR	CGATAATGATATCCCATACC					
INTI4-1F	GAGTGTATGCGCTTGAGAG	<i>intl4</i>	94 °C, 60 s	56 °C, 60 s	72 °C, 30 s	546
INTI4-2R	CCCTTACCTTGCCAGATT					460
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S	94 °C, 60 s	63 °C, 60 s	72 °C, 60 s	≈ 530
536r	GWATTACCGCGGCKGCTG					
Mut-F	GGGTGGTTCTATTGATGC	<i>mutT</i>	94 °C, 60 s	52 °C, 60 s	72 °C, 28 s	289
Mut-R	TGTGTAAGTGCCTAAATG					
Lipo-F	CCCGAATCAGTAAACC	Lipoproteínas	94 °C, 60 s	53 °C, 60 s	72 °C, 28 s	384
Lipo-R	AATGCCTCGTTCTACAGTC					
Trans-F	CTTGATCGCTATGGAACA	Transposasa OrfAB	94 °C, 60 s	54 °C, 60 s	72 °C, 50 s	751
Trans-R	GATGGATAAATGGGTTTCG					
higAB-F	GTCTTGCCTATGGATGC	HigAB	94 °C, 60 s	54 °C, 60 s	72 °C, 50 s	516
higAB-R	GGCTAACTTGATTGCTACC					
IS5-F	ATGGCTAATTGGTTGTCG	IS5	94 °C, 60 s	54 °C, 60 s	72 °C, 28 s	709
IS5-R	GGTACAGCTTAAGTGACGAA					
doc-F	AACCAGGAATGAAAGGAG	Doc	94 °C, 60 s	54 °C, 60 s	72 °C, 28 s	314
Doc-R	TGCGTATTGTGCGTAGAG					
VCR-F	CAAGAGGGACTGTCAACG	Con Mut-R	94 °C, 60 s	54 °C, 60 s	72 °C, 38 s	523
VCR7-F	TAACAAACGCCTCAAGCG					
Vcr2-R-transposase	CGCACTACCACTAACTCAA					

4.9 SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN *intl4* Y 16S EN LA CEPA DE *Vibrio* L22

Para obtener la secuencia de los genes amplificados en los apartados anteriores, se utilizó el método basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos fluorescentes. La purificación de los fragmentos obtenidos por PCR y secuenciación de estos fue realizada por la empresa MacroGenUSA (Maryland-USA). Para ello se envió 40 µL de cada amplificado y 20 µL de cada *primer* a una concentración de 10 pmol/µL a la mencionada empresa para el secuenciamiento de ambas hebras utilizando los iniciadores que se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para el secuenciamiento de los fragmentos.

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Gen blanco</i>
INT-IU	GTTTCGGTCAAGGTTCTG	<i>intl4</i>
INT-ID	GCCAACTTTCAGCACATG	
INT-4U	GTGTTTCGCGAATTTATGC	
INT-4D	ACGGGATAATGGGCTTAA	
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S
536r	GWATTACCGCGGCKGCTG	

4.9.1 Análisis del Secuenciamiento.

La confirmación de la integrasa del superintegrón y la identificación de la cepa portadora del mismo se evaluó mediante el análisis del gen *intl4* y 16S que fueron analizadas usando la secuencia nucleotídica obtenidas después del secuenciamiento comparándolas con las secuencias almacenadas en el *Genbank* con la ayuda de programas bioinformáticos (BLAST de nucleótidos, BioEdit).

V. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Se identificó las siguientes especies de *Vibrio* spp de una población de 170 cepas, el porcentaje de cada especie se observa en la Tabla 3 y los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se observan en el anexo 3.

Tabla 3. Frecuencia de las cepas identificadas de *Vibrio*.

Especies del género <i>Vibrio</i>	N	% (n=170)
<i>V. alginolyticus</i>	121	71.18
<i>V. vulnificus</i>	17	10.00
<i>V. parahaemolyticus</i>	7	4.12
<i>V. carchariae</i>	5	2.94
<i>V. damsela</i>	5	2.94
<i>V. cincinnatiensis</i>	5	2.35
<i>V. fluviales</i>	4	2.35
<i>V. metschnikovii</i>	4	2.35
<i>V. cholerae</i>	2	1,18
<i>V. mimicus</i>	1	0.59

5.2 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS CLÍNICOS.

Se observó que todas las cepas fueron resistentes a varios antibióticos, el 100% es resistente a ampicilina, penicilina y amoxicilina; 22,9% a nitrofurantoína, 18,2% a kanamicina, 14,7% a amikacina, 8,82% a aztreonam, 2,4% a ciprofloxacina, 1,8% a gentamicina, 0,6% a ceftazidima, a cloramfenicol, a cotrimoxazol y a ácido nalidíxico. Ninguna de las cepas presentó resistencia a norfloxacina y tetraciclina (Ver Fig. 6).

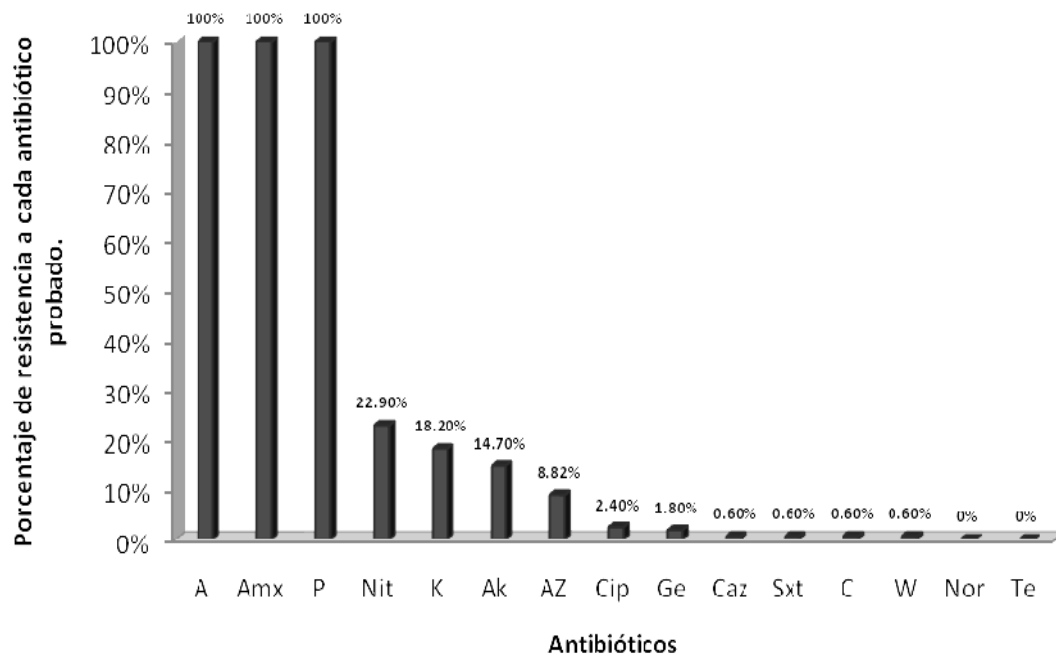


Fig. 6. Frecuencia de resistencia a cada antibiótico probado en las cepas de *Vibrio*. A: Ampicilina, Amx: Amoxicilina, P: Penicilina, Nit: Nitrofurantoína, K: Kanamicina, Ak: Amikacina, Az: Aztreonam, Cip: Ciprofloxacina, Ge: Gentamicina, Caz: Ceftazidima, Sxt: Cotrimoxazol, C: Cloramfenicol, W: Ácido Nalidíxico, Nor: Norfloxacina, Te: Tetraciclina.

Se hallaron 25 antibiotipos diferentes en el total de las cepas siendo los más frecuentes: A, Amx, P (53,53%) y A, Amx, P, Nit (15,29%) (Ver Tabla 4). Además los resultados del antibiograma muestran que todas las cepas son multirresistentes a los antibióticos, pues el 100% de las cepas son especialmente resistentes a la ampicilina, amoxicilina, penicilina.

Tabla 4. Frecuencia de los espectros de resistencia a antibióticos de uso comercial producidas en las cepas de *Vibrio* spp. aisladas en el mar Limeño.

Antibiotipo	Espectro de resistencia antibióticos	Número de aislados	Resistencia (%)
3	A, Amx, P	91	53,53
4	A, Amx, P, Nit	26	15,29
6	A, Amx, P, Nit, K, Ak	8	4,71
4	A, Amx, P, K	8	4,71
4	A, Amx, P, Ak	7	4,12
5	A, Amx, P, Nit, K	4	2,35
5	A, Amx, P, Nit, Ak	4	2,35
7	A, Amx, P, Nit, K, Ak, Az	4	2,35
6	A, Amx, P, Nit, Az, Cip	2	1,18
7	A, Amx, P, K, Ak, Cip, Nit	1	0,59
5	A, Amx, P, K, Ak	1	0,59
6	A, Amx, P, Nit, K, Az	1	0,59
6	A, Amx, P, Nit, K, Cip	1	0,59
5	A, Amx, P, Nit, Az	1	0,59
5	A, Amx, P, Nit, Cip	1	0,59
5	A, Amx, P, Nit, C	1	0,59
6	A, Amx, P, Nit, Az, Ge	1	0,59
6	A, Amx, P, Nit, Az, Caz	1	0,59
6	A, Amx, P, Nit, Sxt, W	1	0,59
5	A, Amx, P, K, Az	1	0,59
4	A, Amx, P, Az	1	0,59
5	A, Amx, P, Az, Cip	1	0,59
5	A, Amx, P, Az, Ge	1	0,59
5	A, Amx, P, Ak, Cip	1	0,59
4	A, Amx, P, Ge	1	0,59

A: Ampicilina, Amx: Amoxycilina, P: Penicilina, Nit: Nitrofurantoína, K: Kanamicina, Ak: Amikacina, Az: Aztreonam, Cip: Ciprofloxacina, Ge: Gentamicina, Caz: Ceftazidima, Sxt: Cotrimoxazol, C: Cloramfenicol, W: Ácido Nalidíxico, Nor: Norfloxacina, Te: Tetraciclina.

5.3 PRESENCIA DEL CROMOSOMA 2

Realizada la extracción del cromosoma 2, se observó que la cepa de *V. cholerae* L22 hospedaba un plásmido de aproximadamente 1400 pb y el cromosoma 2 cuyo peso molecular escapa al marcador usado. (Ver Fig. 7).

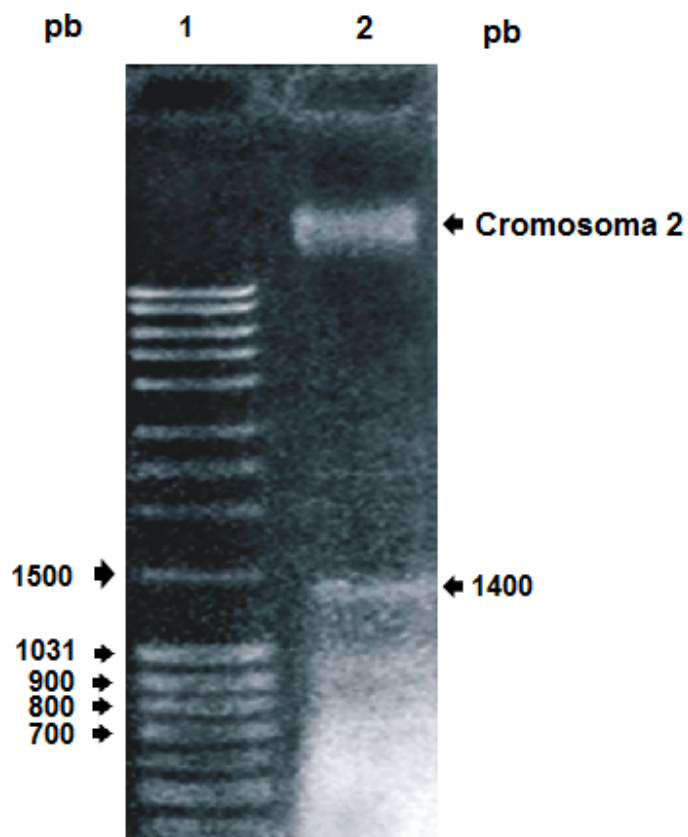


Fig. 7. Representación del Cromosoma 2 aislado en la cepa de *Vibrio* L22.

1: Marcador de Peso Molecular *MassRuller* (Fermentas).

2: Cromosoma 2 de *Vibrio* L22.

5.4 PRESENCIA DEL INTEGRÓN DE CLASE 1, 2, 3 Y EL SUPERINTEGRÓN

Después de realizar el PCR a las cepas, sólo la cepa de *Vibrio* L22 mostró tener el gen *intI4* (Fig. 8) dando un amplificado de 936 pb, entonces utilizando los iniciadores INT-4U, INT-4D, INTI-1F, INTI-2R se amplificaron los fragmentos de 546 y 460 pb (Fig. 8) de la integrasa de este superintegrón. Los resultados del secuenciamiento (Ver Figs. 9, 10, 11 y 12) de los amplificados usando estos

iniciadores muestran una homología del 98 al 99% después de haber realizado el BLAST de nucleótidos.

5.4.1 Presencia del gen *intl4* en el cromosoma 2 aislado.

Después de estandarizar la PCR para el gen *intl4*, se realizó la reacción tomando como DNA molde el DNA cromosómico total y el cromosoma 2, observando que el gen *intl4* se amplificó tanto en ambos moldes, encontrando y confirmando que esta integrasa se encuentra en el cromosoma 2 aislado (Ver Fig. 8).

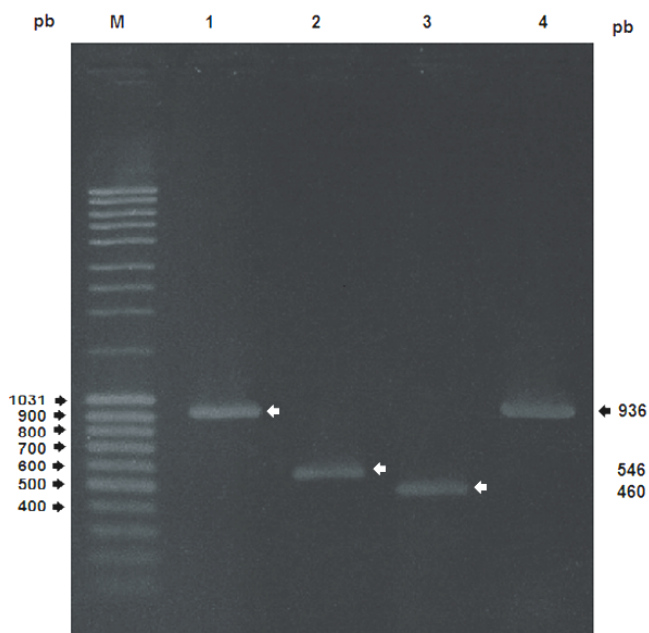


Fig. 8. Amplificación por PCR del gen *intl4* del integrón de clase 4 o superintegrón en la cepa de *Vibrio* L22.

M: Marcador de Peso Molecular MassRuller (Fermentas).

1: Amplificación del gen *intl4* del DNA total.

2 y 3: Amplificación gen *intl4* realizados para el secuenciamiento.

4: Amplificación del gen *intl4* del cromosoma 2.



Fig. 9. Cromatogramas del secuenciamiento del gen *int4* en la cepa L22 con el iniciador INT-4D.

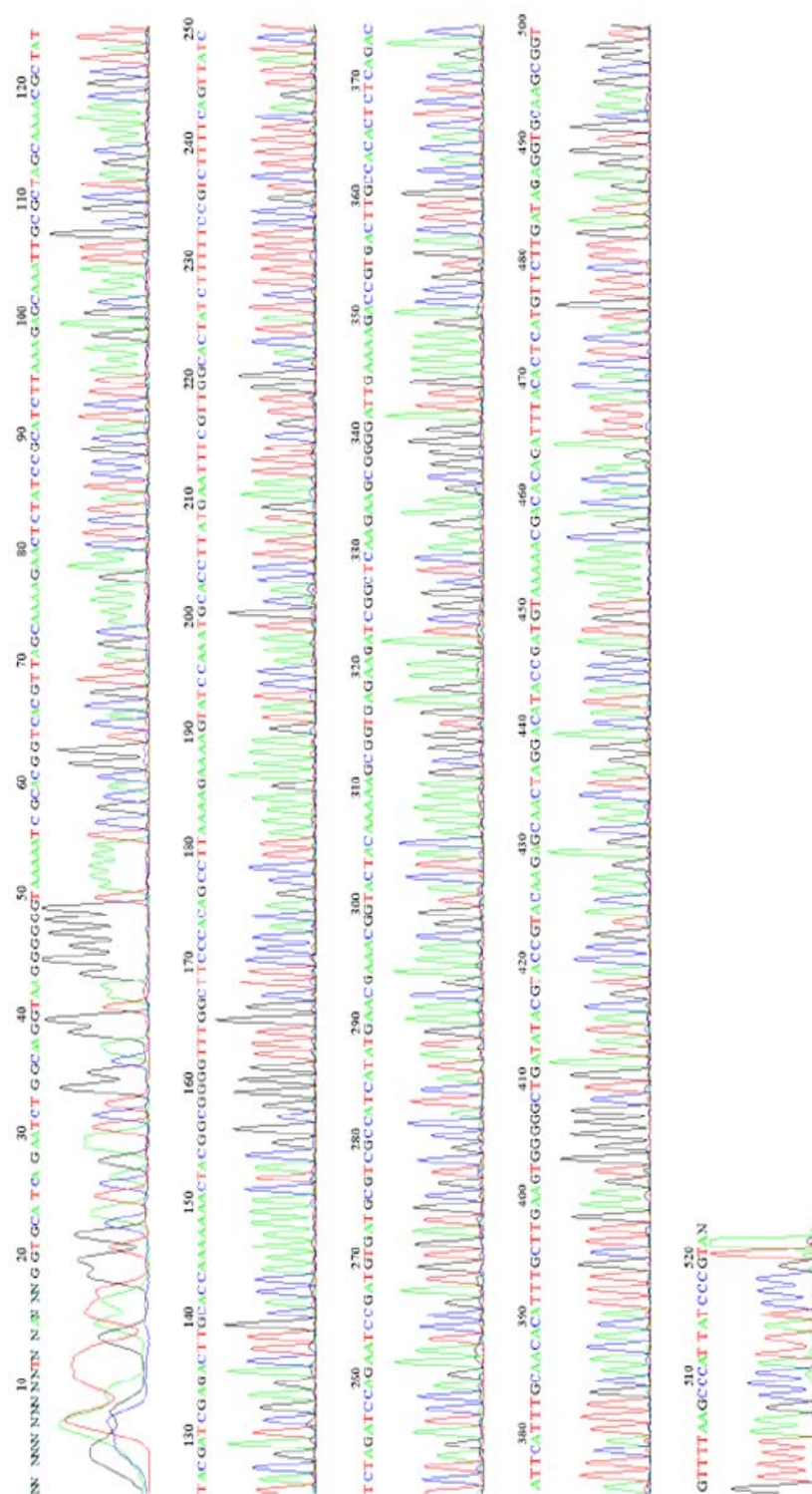


Fig. 10. Cromatogramas del secuenciamiento del gen *int14* en la cepa L22 con el iniciador INT14-1F.

File: 100513-14_C01_B-INT-4U.ab1 Run Ended: 2010/5/14 4:52:41 Signal G: 2444 A: 2948 C: 2189 T: 2849
Sample: B_INT-4U Lane: 13 Base spacing: 15.264478 452 bases in 5450 scans Page 1 of 1

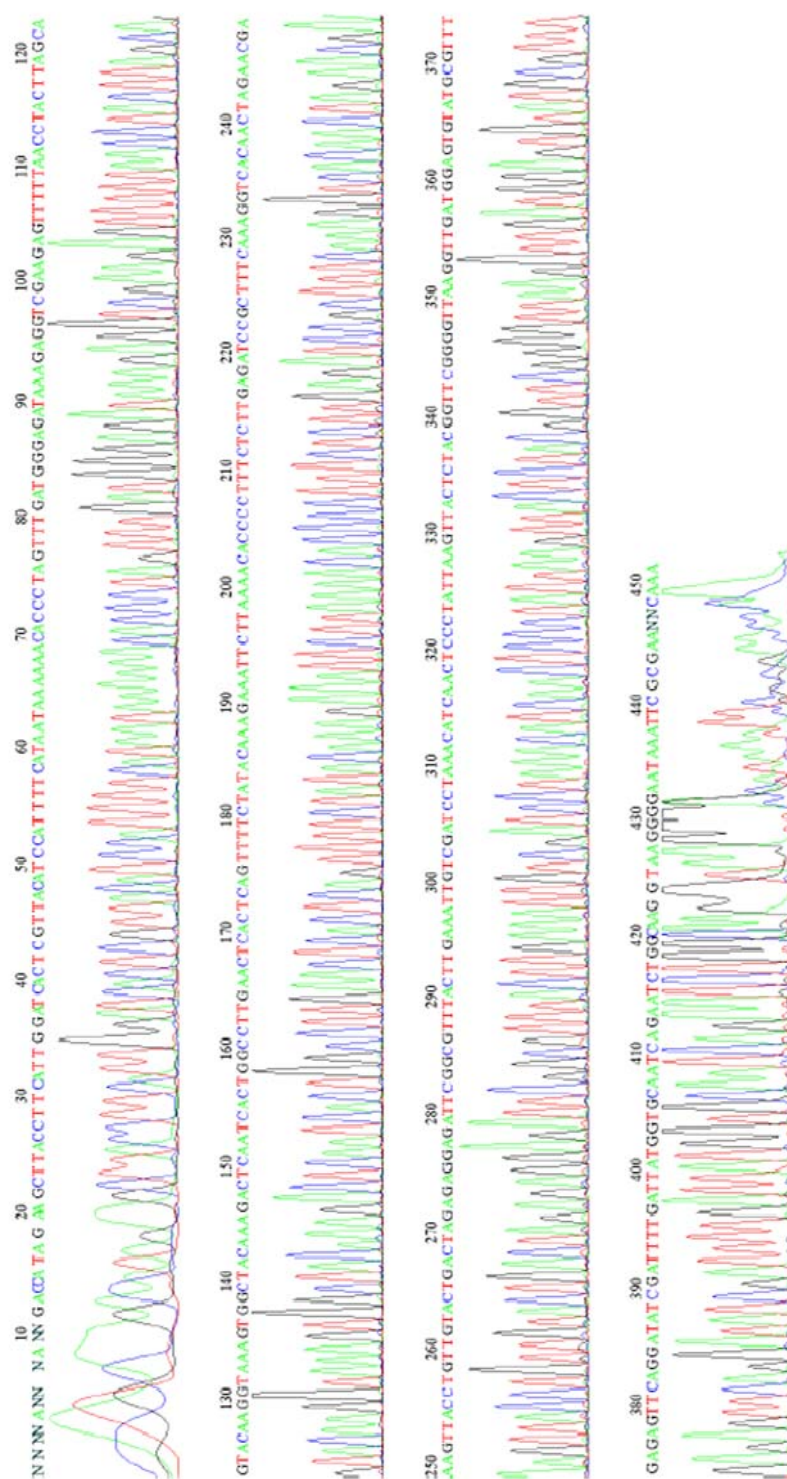


Fig. 11. Cromatogramas del secuenciamiento del gen *int14* en la cepa L22 con el iniciador INT-4U.

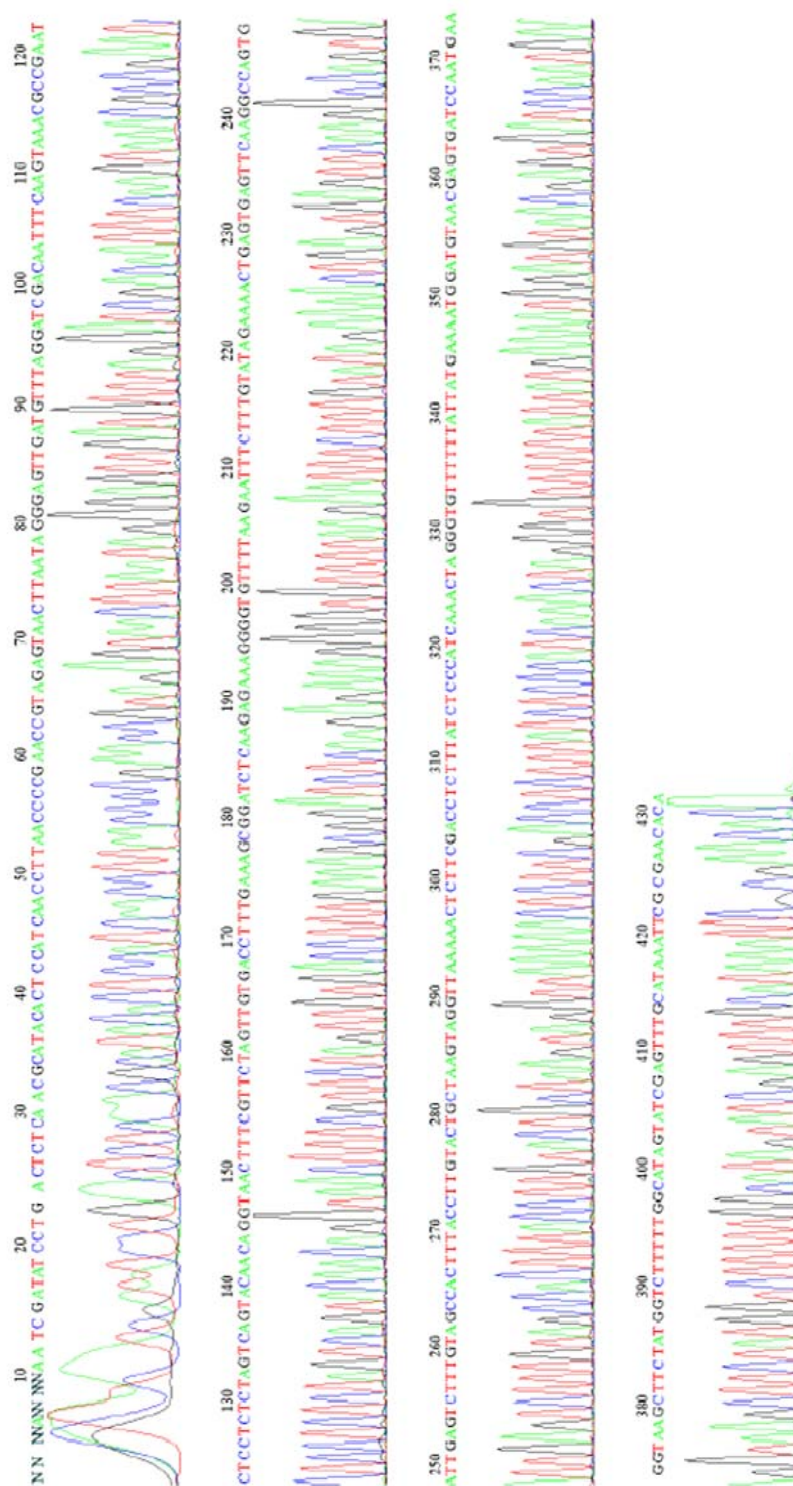


Fig. 12. Cromatogramas del secuenciamento del gen *int4* en la cepa L22 con el iniciador INT1-2R.

5.5 RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS CON LA PRESENCIA DE INTEGRONES

Después del antibiograma, se observó que todas las cepas presentaban los mismos patrones de resistencia a antibióticos, especialmente con las Penicilinas, por lo que no se encontró alguna relación directa que ligue la resistencia a antibióticos con el integrón.

5.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA L22 POR EL ANÁLISIS DEL GEN 16S

Se realizó la identificación molecular de la cepa L22 por el análisis del gen 16S porque este mostró la presencia del gen *intl4* del superintegrón, después de realizar el BLAST de nucleótidos se observó que la cepa es 99% idéntica al gen 16S de *V. cholerae*, pues reportes como de Mazel *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Fluit & Schmitz, 2004; reportan la presencia de este superintegrón en *V. cholerae*. Los resultados del secuenciamiento del gen 16S se muestran en las figuras 13 y 14.

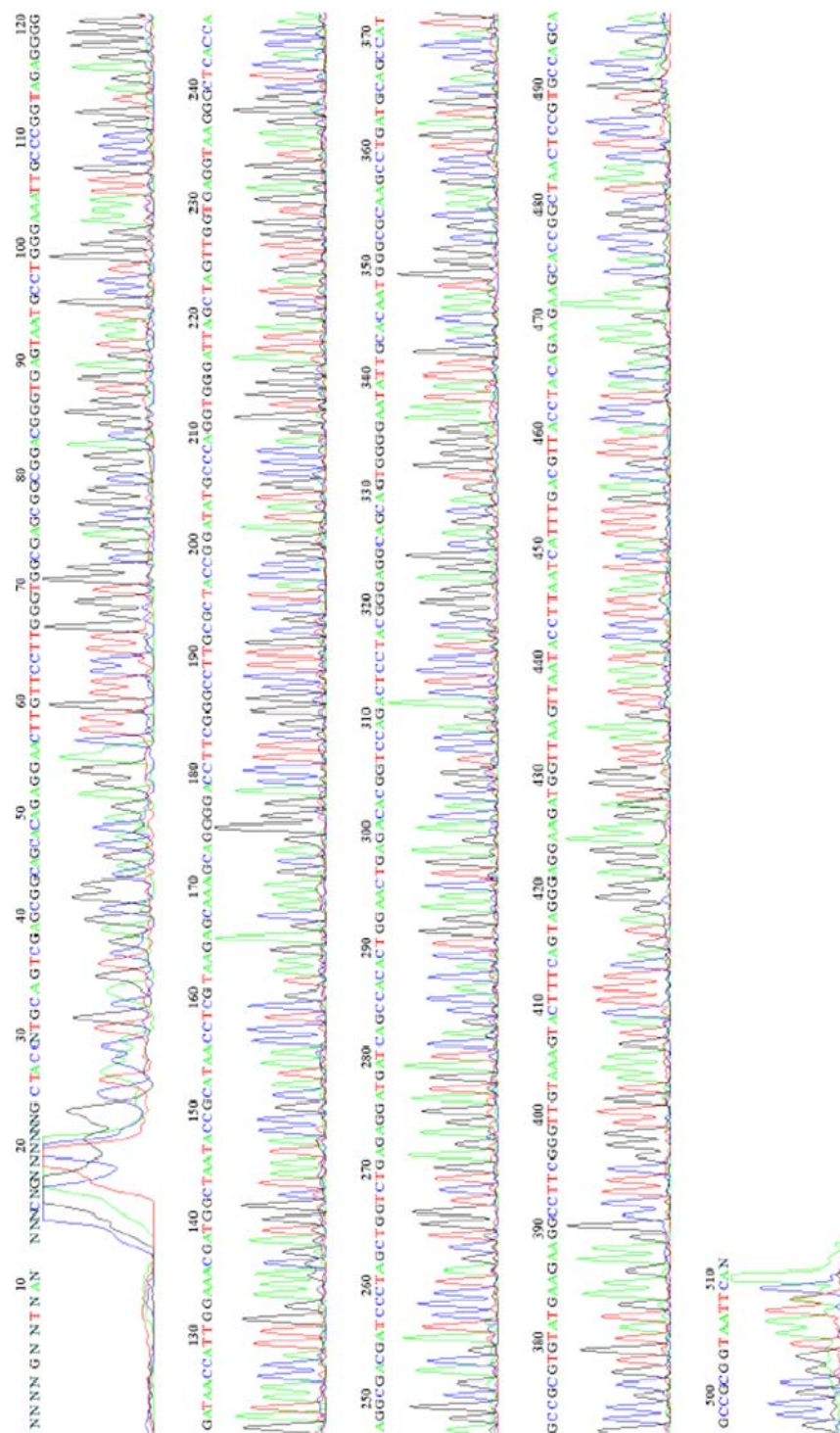


Fig. 13 Cromatogramas del secuenciamiento del gen 16S en la cepa L22 usando el iniciador 27f.

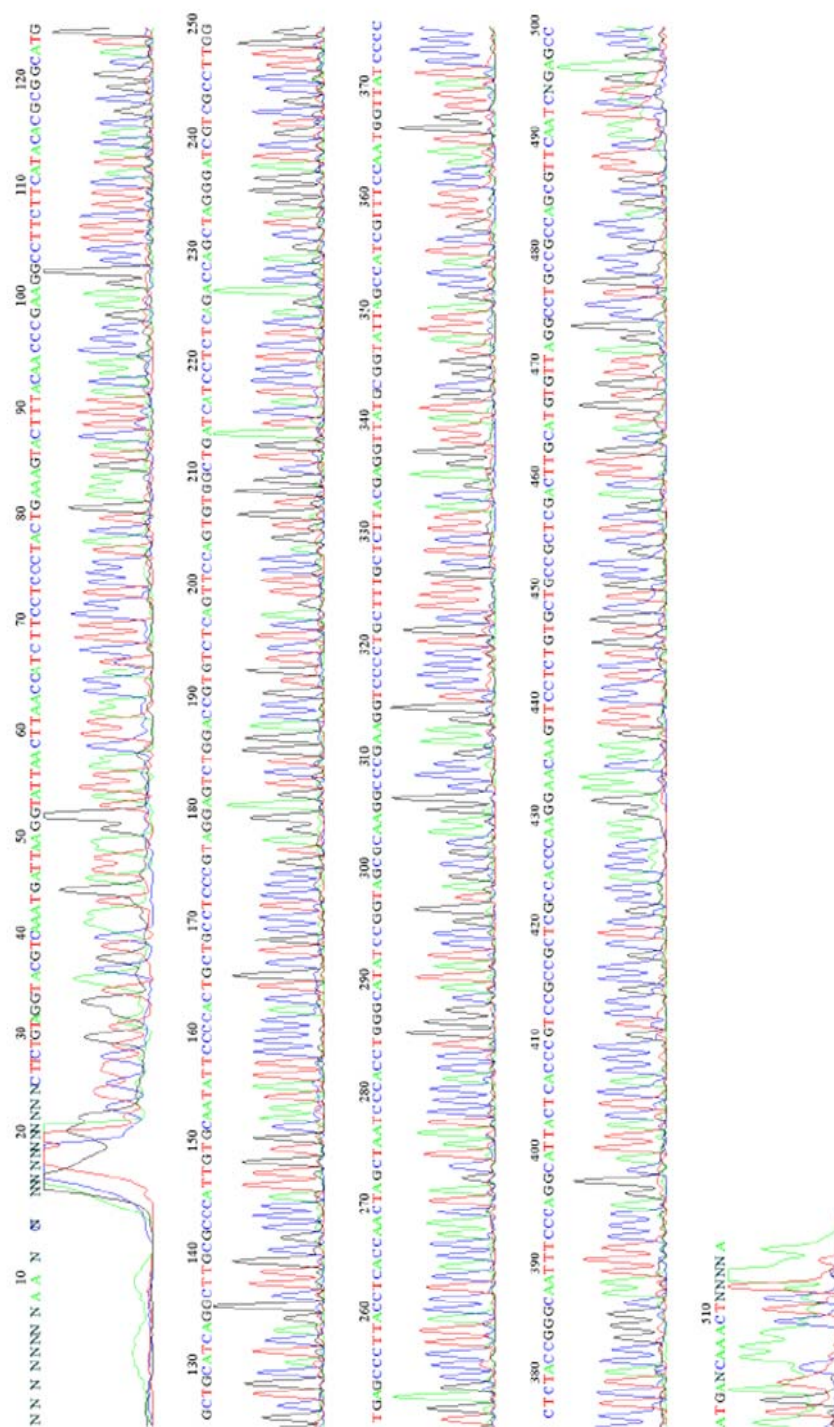


Fig. 14 Cromatogramas del secuenciamento del gen 16S en la cepa L22 con el iniciador 536r.

5.7 PRESENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

Realizada la PCR para la amplificación del gen de la hemaglutinina manosa resistente, *mutT*, transposasa OrfAB, Secuencias de inserción IS5, lipoproteínas, loci *HigAB* y *doc*; se confirmó la presencia del *mutT*, transposasa OrfAB e *HigAB* (Fig. 15).

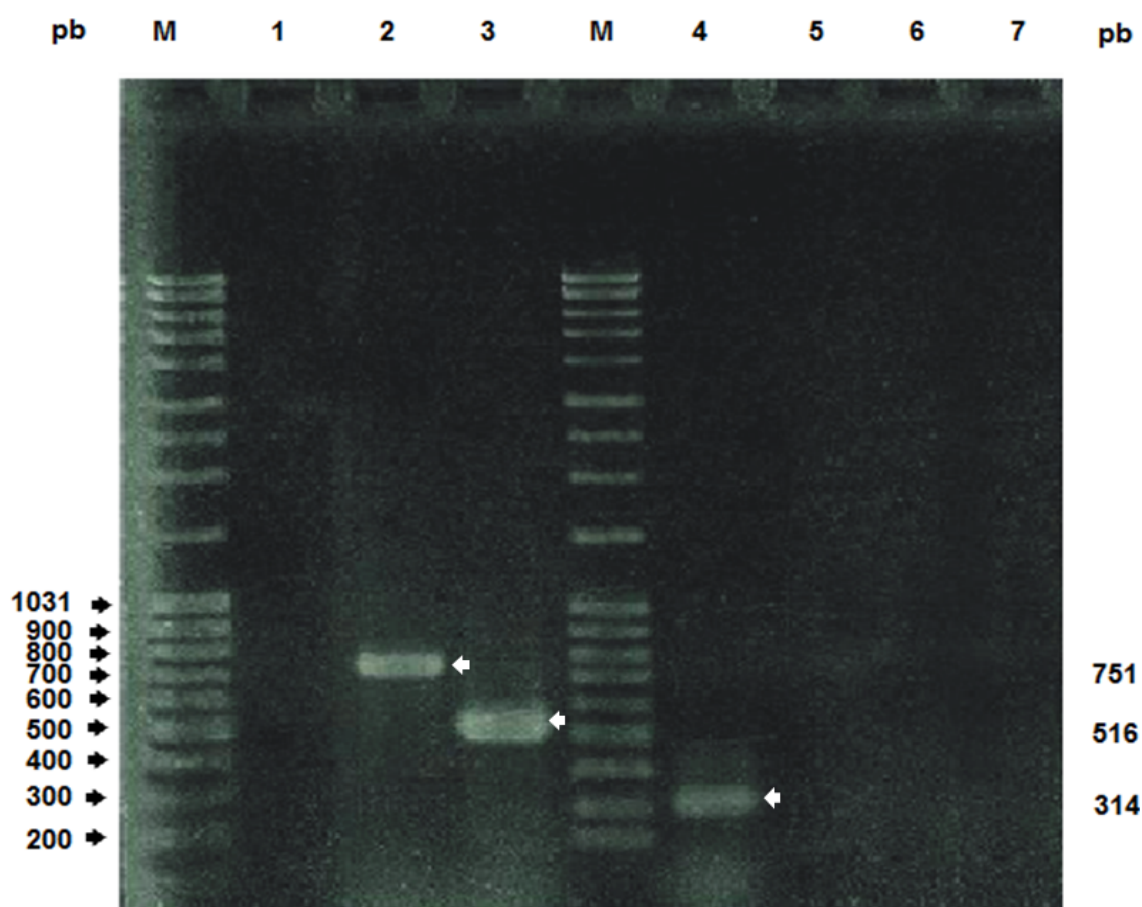


Fig. 15. Amplificación del gen del *mutT*, transposasa OrfAB e *HigAB*. M: Marcador de Peso Molecular MassRuller (Fermentas). 1: hemaglutinina manosa resistente. 2: transposasa OrfAB. 3: *HigAB*. 4: *mutT*. 5: Secuencias de inserción IS5. 6: lipoproteínas. 7: *doc*.

5.8 CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE FUNCIÓN METABÓLICA O DE VIRULENCIA REPORTADOS PARA EL SUPERINTEGRÓN

Así mismo se realizó el PCR con los iniciadores VCR-F, VCR7-F y Vcr2-R-transposase; para comprobar y confirmar que estos genes de virulencia están ubicados en el superintegrón, observando que sólo el gen relacionado a la familia de proteínas *mutT* estaba alojado en tal (Ver Fig. 16).

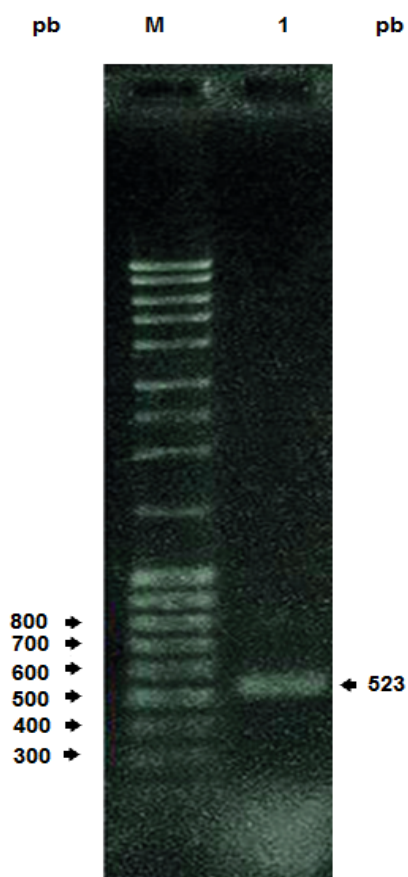


Fig. 16. Presencia del *mutT* en el superintegrón de la cepa de *Vibrio* L22.

M: Marcador de Peso Molecular MassRuller (Fermentas).

1: *mutT* alojado en el superintegrón.

VI. DISCUSIÓN

El género *Vibrio* está ampliamente distribuido en aguas costeras, lo que queda ratificado en esta investigación, logrando aislar cepas de *V. cholerae* y otros *Vibrio* spp, cómo *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. hollisae*, que son reconocidos como patógenos humanos (Eiler *et al.*, 2006); en el Perú algunas de estas especies han sido reportadas previamente en muestras de pacientes con cuadro de diarrea aguda (Ibarra *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2004).

En este trabajo se reporta sólo dos cepas de *V. cholerae*, esto puede deberse especialmente al factor temperatura de las masas de agua del litoral limeño que tiende a estar en un promedio de 16 a 17 °C, la temperatura fría de la costa peruana influenciada por la Corriente de Humbolt, no facilitaría la proliferación de esta especie. Sin embargo, la temperatura no es el único factor imprescindible para la viabilidad de *V. cholerae* en el ambiente, pues varios estudios demuestran que esta especie normalmente está presente en ambientes acuáticos tropicales y templados, de manera que su distribución también es afectada por otros factores abióticos como pH, salinidad, exposición a rayos UV, entre otros (Nair *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2004, Sedas, 2007; Martinez-Urtaza *et al.*, 2008).

La presencia de *Vibrio cholerae* O1 en el Perú tiene características endémicas y la ocurrencia de la bacteria en el litoral peruano obedece a factores ambientales, facilitados por el Evento El Niño Oscilación Sur (ENOS) los cuales están asociados con el incremento de los casos de cólera (Ibarra *et al.*, 1999). Son pocos los reportes que tratan sobre el aislamiento de esta especie en muestras ambientales de agua mar en el litoral peruano, pues sólo Gil *et al.* (2004) reportaron haber identificado 10 (5,6%) cepas de *V. cholerae* de un total de 178 muestras, siendo también identificadas por la prueba directa de fluorescencia con anticuerpos en 26 de unas 159 muestras (16.4%). En este trabajo se verificó la identificación de la especie por API 20 NE y PCR resultando éste el segundo

reporte sobre el aislamiento de *V. cholerae* en la costa peruana con una frecuencia de 1,18%.

Así mismo se aisló e identificó un número significativo de *V. alginolyticus* (71,18%), siendo ésta la especie que predomina bajo las condiciones climáticas de áreas marino costeras del litoral limeño. En relación a *V. parahaemolyticus*, sólo se obtuvo un 4,12% del total de las cepas. La cepa L22 mostró la presencia del gen *int14* del Superintegrón, después de realizar el BLAST de nucleótidos se observó que la cepa es 99% idéntica al gen 16S de *V. cholerae*, pues reportes como de Mazel *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Fluit & Schmitz, 2004; reportan la presencia de este superintegrón en *Vibrio cholerae*.

En relación a la resistencia a antibióticos clínicos, se hallaron 25 antibiotipos diferentes siendo los más frecuentes: A, Amx, P (53,53 %) y A, Amx, P, Nit (15,29 %). Además los resultados del antibiograma muestran que todas las cepas son multirresistentes a los antibióticos, pues el 100% de las cepas son especialmente resistentes a la ampicilina, amoxicilina, penicilina (pertenecientes al grupo de las penicilinas), siendo éstas cepas multirresistentes a tales antibióticos.

Los estudios de resistencia a antibióticos en este género se realizaron especialmente en *V. cholerae*, los antibiogramas que se realizaron en 1991, cuando este microorganismo apareció originando la epidemia del cólera en el Perú, no señalaron alguna resistencia tal como se menciona en el trabajo publicados ese año por Guevara *et al.* (1991). Sin embargo, la resistencia a antibióticos en cepas clínicas fue aumentando, Tolmos (1992), reportó 1,2% de resistencia a ampicilina, Guevara *et al.* (1994) reportaron 8,4% de resistencia a ampicilina, Leo (2000) reporta en cepas de *V. cholerae* O1 de origen clínico aisladas en los años 1991, 1992 y 1993 una frecuencia de resistencia del 5,7% siendo el 1,9% del total de las cepas resistente a ampicilina; posteriormente Ibarra *et al.* (2000) relataron, en cepas de *V. cholerae* también de origen clínico aisladas

en 1998, una resistencia a penicilina del 3,1%.y Guevara *et al.* (2000) una resistencia a la ampicilina del 24,7%. Dabanch *et al.* (2009) no encontraron ninguna cepa de *V. parahaemolyticus* susceptible a ampicilina en un brote infeccioso en Chile. Lo que se está observando es que con el paso de los años la resistencia a antibióticos está aumentando, conclusión que concuerda con los resultados obtenidos por Ibarra & Alvarado (2007), pues como ya se mencionó líneas arriba, las cepas en estudio presentan una resistencia al grupo de las penicilinas en un 100%, en comparación con reportes anteriores. Destaca la expresión de resistencia a ciprofloxacina y amikacina de la cual no hay muchos reportes en cepas de origen ambiental.

En relación a cepas de origen ambiental Stabili *et al.* (2010) reportan una alta resistencia a ampicilina y estreptomycin en *Vibrio* sp. AO1; Vaseeharan *et al.* (2005) también reportaron un 100% de resistencia a ampicilina en cepas de *Vibrio* spp aisladas de agua de estanque. La resistencia a las penicilinas en el género *Vibrio* estaría mediada por producción de β -lactamasas (Ferreira *et al.*, 1992; Fluit & Schmitz, 2004) localizadas en el cromosoma o en algún plásmido de resistencia (Kruse *et al.*, 1995; Choury *et al.*, 1999; Teo *et al.*, 2000; Dalsgaard *et al.*, 2000; Ceccarelli *et al.*, 2006).

Los resultados sugieren que la resistencia encontrada, en las cepas estudiadas, no está ligada con algún integrón de resistencia como fue postulado al inicio de este trabajo, considerando varios reportes previos para el género *Vibrio* y otras especies, en los que se reporta la presencia de β -lactamasas asociadas a integrones, especialmente en el integrón de clase 1 (Dalsgaard *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2010). La resistencia a los demás antibióticos podría estar mediada por la producción de proteínas de membrana (porinas) o proteínas transportadoras como la VA2212 (fadl) que otorga resistencia a kanamicina, ácido nalidíxico en *V. alginolyticus* (Xiong *et al.*, 2010).

En relación al grupo de antibióticos asociados con la vigilancia de resistencia antimicrobiana (ampicilina, cloramfenicol, cotrimoxazol, tetraciclina) (Sacsquispe & Velásquez, 2002), las cepas de estudio son resistentes a la ampicilina, siendo mayormente sensibles a los demás antibióticos de este grupo; en la misma referencia los autores mencionan que las cepas de *V. cholerae* tienden a tener una resistencia natural a la penicilina, dato que se corrobora con los resultados de este trabajo y con las demás especies de *Vibrio*.

Este estudio describe la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en cepas ambientales aislados del litoral limeño encontrando que tales cepas pueden ser reservorios de genes de resistencia. La elevada prevalencia y el depósito de múltiples cepas resistentes a los antibióticos indican la necesidad de realizar una vigilancia epidemiológica para observar periódicamente los patrones de susceptibilidad antimicrobiana.

El aislamiento del cromosoma 2 mostró un plásmido de 1400 pb el cual no se consideró por no ser objetivo de este estudio, se confirmó la presencia del cromosoma 2 al amplificar el loci *HigAB*, que según Heidelberg *et al.*, (2000); Christensen-Dalsgaard & Gerdes (2006) y Budde *et al.*, (2007); este loci es encontrado en el cromosoma 2 y éste ayudaría al mantenimiento de tal en el hospedero, ya que tal cromosoma tiene importancia tanto metabólica como de virulencia.

Después de estandarizar los parámetros de la PCR, no se observó la presencia del gen de la integrasa de clase 1 (*intI1*) y de clase 2 (*intI2*) en el total de las cepas, resultado no concordante con otros artículos pues dichos integrones ya han sido reportados para el género *Vibrio*, especialmente en cepas de *V. cholerae* de origen clínico y ambiental (Ceccarelli *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Opintan *et al.*, 2008). En relación al integrón de clase 3 éste tampoco fue observado, cabe resaltar al respecto que hasta el momento no hay reportes que

confirman la presencia de este integrón en la familia Vibrionaceae tanto en cepas de origen clínico y ambiental. Así mismo se observó la presencia del gen *intl4* de la integrasa del superintegrón en *V. cholerae*, siendo este último reportado para este género (Clark *et al.*, 2000; Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Todas las cepas de *Vibrio* utilizadas fueron aisladas de muestra de agua de mar y la ocurrencia de la presencia de integrones en bacterias de origen ambiental es baja, ya que en este trabajo la presencia de integrones (el de clase 4) en todas las cepas de *Vibrio* evaluadas en este trabajo es de 0,59%, resultados obtenidos por Laroche *et al.*, (2009) en cepas de *E. coli* aislados de estuarios, determinó una frecuencia del 11% para la presencia de los genes *intl1* e *intl2*, en este caso el gen *intl3* no fue detectado; Ozgumuz *et al.*, (2007) determinaron una frecuencia del 2,5% en la presencia del integrón de clase 1, también en cepas de *E. coli* aislados de aguas de manantial o de uso público. En relación a *Vibrio*, Bakhshi *et al.* (2009) reportó una frecuencia del 5,4% en la presencia del integrón de clase 1 en cepas de *V. cholerae* no-O1 y no-O139 aislados de ambientes acuáticos confirmando que la presencia de integrones en cepas de origen ambiental es baja, pero en cambio Taviani *et al.* (2008) reportaron la frecuencia de un 26,3% de cepas de *Vibrio* spp aisladas de muestras de agua de mar y de río, portadoras del integrón de clase 1; contradiciendo lo ya mencionado.

Las amplificaciones realizadas con los iniciadores para las integrasas (Tabla 1) relacionando con los resultados de los antibiogramas, no se encontró alguna relación de resistencia a antibióticos con los cuatro tipos de integrones probados, que fue uno de los objetivos de este trabajo, pues al encontrar que un buen número de cepas presenta la multirresistencia a antibióticos daba indicio de la presencia de algún integrón portador de los genes de resistencia, estos resultados no se relacionan con lo reportado por Fluit & Schmitz (2004), Rajpara *et al.*, (2009); pues ellos reportan que varios grupos bacterianos tienden a ser más resistentes a diversos antibióticos, especialmente en cepas de brotes hospitalarios, y que dicha resistencia está asociada significativamente a la

presencia de algún integrón en el microorganismo. La baja asociación entre los genes de resistencia a antibióticos e integrones sugiere que la selección y difusión de tales resistencias sólo ha tenido poca o ninguna influencia en la propagación de los integrones y viceversa en estas cepas de *Vibrio* aisladas en el litoral limeño. Sin embargo, el mantenimiento de los diferentes tipos de integrones encontrados en cepas provenientes de otras fuentes de aislamiento, como los ambientes clínicos por ejemplo, refleja una continua preservación y/o selección previa de algún plásmido u otro tipo de material genético específico en el que estos integrones puedan estar hospedados y mantenidos en sus hospederos.

Trucksis *et al.*, (1998) y Rowe-Magnus *et al.*, (2001), reportan la presencia del gen *intI4* en el cromosoma 2, resultado similar al que se obtuvo en este trabajo después de la reacción de PCR con el DNA plasmídico. Pues a diferencia de los demás integrones que están asociados a elementos genéticos móviles (plásmidos por ejemplo), este superintegrón tuvo una coevolución significativa con el genoma del hospedero haciendo que éste sea altamente sedentario (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Además este superintegrón al estar alojado en el cromosoma 2 difícilmente sería retirado de este genoma, pues como se sabe este cromosoma 2 posee genes de importancia para la viabilidad de la cepa portadora, además por su tamaño sería muy difícil su transferencia horizontal a otras cepas receptoras de material genético extracromosómico. Las funciones del cromosoma 2 estarían relacionadas con el superintegrón, ya que Rowe-Magnus *et al.*, (2002) reportaron que los genes *cassettes* de *V. cholerae* codifican para una variedad de funciones adaptativas incluyendo actividades metabólicas, factores de virulencia y un potencial determinante en la resistencia a antibióticos, haciendo que esta se adapte rápidamente a nuevos nichos ecológicos.

En relación al superintegrón, hay reportes publicados sobre la presencia de genes de función metabólicas o de virulencia, entre ellas: la proteína resistente a fosfomicina y glutatión transferasa; varias enzimas que participan en el

metabolismo de DNA (familia de proteínas mutT, transposasa OrfAB, Secuencias de inserción IS5, y una integrasa), genes potenciales de virulencia (hemaglutininas y lipoproteínas) y tres genes que codifican productos génicos similares a las proteínas de adhesión al hospedero (higA, higB y doc); genes como la cloramfenicol acetiltransferasa, *qnr* y *dfr6*, los cuales otorgan resistencia al cloramfenicol, ciprofloxacina y al trimethoprim respectivamente (Franzon *et al.*, 1993; Barker *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1997; Heidelberg *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2008; Kumar & Thomas, 2009); por lo que se diseñaron iniciadores para confirmar la presencia y ubicación de estos genes en el superintegrón. En este caso no se diseñaron iniciadores para los genes de resistencia a cloramfenicol, ciprofloxacina y fosfomicina porque la cepa que presentó el superintegrón (*V. cholerae* L22) no mostró alguna resistencia hacia estos antibióticos.

Debido a reportes previos en relación a la hemaglutinina manosa y fucosa resistente (HMFR) (Barker *et al.*, 1994; Franzon *et al.*, 1993, Clark *et al.*, 1997; Carattoli, 2001), los genes *doc*, Secuencias de Inserción IS5, y lipoproteínas en esta cepa (Heidelberg *et al.*, 2000), localizado en genes *cassettes* ligados a VCRs en el superintegrón de *V. cholerae*, se trató de evidenciar la presencia de estos locus en la cepa L22 *intI4*⁺ mediante pruebas de PCR, pues hay reportes que asocian la presencia de estos factores de virulencia con el superintegrón, sin embargo estos no fueron evidenciados. La ausencia de estos factores de virulencia se debería a que la cepa L22 que presentó el gen *intI4* fue aislado de una muestra ambiental (agua de mar), pues cepas aisladas de muestras ambientales tienden a no presentar genes de patogenicidad; Núñez *et al.*, (2009), mostraron que genes encontrados en Islas de Patogenicidad de *V. parahaemolyticus* sólo son encontrados en cepas de aislados clínicos mas no de los que provienen de muestras ambientales; Zhang *et al.*, (2004) también reporta que los genes de patogenicidad *tdh* y *trh* están presentes preferentemente en cepas de *V. parahaemolyticus* de origen hospitalario, estos genes no están presentes en cepas de origen ambiental.

Se observó la presencia de la Transposasa OrfAB, pero con las pruebas adicionales se demostró que tal secuencia no está ubicada en el Superintegrón, esto se debería a la capacidad de translocación que posee dicho material genético y por lo tanto éste se situaría en otra porción del cromosoma 2. El loci *HigAB* o llamado también loci Toxina-antitoxina (TA), está presente en el cromosoma 2 mas no en el superintegrón, datos no relacionados con los obtenidos por Budde *et al.*, (2007) y Heidelberg *et al.*, (2000), quienes reportan que tal loci está ubicado en el superintegrón, pero resultados obtenidos por Christensen-Dalsgaard & Gerdes (2006) demuestran que tal loci contribuye en el mantenimiento y estabilidad genética del cromosoma 2, dicho resultado se debe tomar en cuenta con los obtenidos en el trabajo, ya que el *HigAB* ayudaría en la estabilidad de este cromosoma en la cepa de *Vibrio* L22, los resultados son comparables con los obtenidos por Budde *et al.*, (2007), Christensen-Dalsgaard & Gerdes (2006), Heidelberg *et al.*, (2000).

En relación al gen relacionado a la familia de proteínas mutT, éste sí está ubicado en el superintegrón, siendo este resultado comparable con el obtenido por Heidelberg *et al.*, (2000), ya que este gen tiene la función de hidrolizar análogos mutagénicos como 8oxo-dGTP y 8oxo-GTP, eliminando las bases oxidadas de estos nucleótidos e impidiendo que éstos se incorporen en la síntesis del DNA y de RNA (Kamiya *et al.*, 2004; Rotman & Kuzminov, 2007), por lo que sería importante para la cepa de *Vibrio* L22 mantener este gen *cassette*. Las bacterias de origen ambiental siempre están expuestas a radiación UV y otros factores de estrés, la sensibilidad a los rayos UV pueden tener un papel significativo en la reducción de la supervivencia y la capacidad de propagación del *Vibrio* en el océano (Abboudi *et al.*, 2008; Zabala *et al.*, 2009). En este caso, en relación al Superintegrón, la cepa mantendría genes *cassettes* de vías metabólicas, los patrones de resistencia a las penicilinas estarían ligadas a otro material genético,

en comparación a otros estudios realizados en *Vibrio* (Ripabelli *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2008).

Hasta el momento este sería el primer trabajo que reporta la evaluación de factores de resistencia (integrones) y patrones de resistencia a diversos antibióticos de uso clínico en cepas de *Vibrio* aisladas en el litoral limeño, y también el segundo trabajo que reportaría el aislamiento e identificación de Vibrios de origen ambiental y en especial por el aislamiento de *V. cholerae*.

VII. CONCLUSIONES

- Se reporta a *V. alginolyticus* como la especie más frecuente en el litoral limeño, habiéndose identificado un total de diez especies de *Vibrio*, entre ellas al *V. cholerae*.
- Todas las cepas muestran resistencia a antibióticos, observándose una resistencia natural a la ampicilina, amoxicilina y penicilina.
- Por la alta prevalencia de cepas con resistencia a antibióticos, nos indican que todas estas pueden ser reservorios de genes de resistencia en los ambientes marinos del litoral limeño.
- Hay ausencia de integrones en las cepas estudiadas, a excepción de la cepa L22 que porta el superintegrón en el cromosoma 2.
- La resistencia a antimicrobianos de uso clínico observada no está relacionada con la presencia de integrones de resistencia en las cepas estudiadas.
- El superintegrón hospedado en la cepa L22 no porta ningún gen *cassette* asociado a factores de virulencia reportados hasta la fecha para este elemento genético, estando sólo presente el gen *cassette mutT* de función metabólica.
- La secuencia de la integrasa del superintegrón muestra una homología del 98 al 99%, indicando que es un gen altamente conservado.

VIII. RECOMENDACIONES

- La identificación de las cepas a nivel de especie se debe realizar con diferentes métodos de identificación, ya que las cepas aislados de ambientes tienden a ser muy variables con las pruebas bioquímicas convencionales,
- Debido a los resultados encontrados en los antibiogramas, se debe realizar evaluaciones periódicas del espectro antimicrobiano en las bacterias de origen marino, ya que al poseer estos patrones de resistencia, son un posible reservorio de marcadores de resistencia que pueden ser transferidos a otras especies bacterianas pudiendo de esta manera llegar a afectar directa o indirectamente a la población humana.
- Se debe evaluar otro tipo de material genético (cromosoma, plásmidos o transposones) que estarían portando tales patrones de resistencias a antimicrobianos, siendo importante evaluar si tales resistencias se observan en plásmidos porque este puede tener la capacidad de conjugación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abboudi M, Surget SM, Rontani JF, Sempéré R, Joux F.** Physiological alteration of the marine bacterium *Vibrio angustum* S14 exposed to simulated sunlight during growth. *Curr Microbiol.* 2008; 57(5): 412-417.
- Bag PK, Maiti S, Sharma C, Ghosh A, Basu A, Mitra R, Bhattacharya SK, Nakamura S, Yamasaki S, Takeda Y, Balakrish Nair G.** Rapid spread of the new clone of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor in cholera endemic areas in India. *Epidemiol Infect.* 1998;121 (2): 245-251.
- Bakhshi B, Barzelighi HM, Adabi M, Lari AR, Pourshafie MR.** A molecular survey on virulence associated genotypes of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* in aquatic environment of Tehran, Iran. *Water Res.* 2009; 43 (5):1441-1447.
- Barker A, Clark CA, Manning PA.** Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol.* 1994; 176(17): 5450-5458.
- Biskri L, Bouvier M, Guérout A-M, Boissard S, Mazel D.** Comparative Study of Class 1 Integron and *Vibrio cholerae* Superintegron Integrase Activities. *Journal of Bacteriology.* 2005; 187 (5): 1740–1750
- Bross M, Soch K, Morales R, Mitchell R.** *Vibrio vulnificus* Infection: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2007; 76 (4):539-44.
- Budde PP, Davis B, Yuan J, Waldor M.** Characterization of a higBA Toxin-Antitoxin Locus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2007, 189(2): 491–500.
- Cáceres J, Vásquez R.** Enfermedades de moluscos cultivados en el Noroeste de México. 2003. http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=85.

- Caffer MI, Terragno R, González S, Viñas MR, Pichel M, Binsztein N.** Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. WHO Global Salm Surv, 2007.
- Carattoli A.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 2001; 32(3-4):243-59.
- Ceccarelli D, Salvia A, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo1 M.** New Cluster of Plasmid-Located Class 1 Integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a dfrA15 Cassette-Containing Integron in *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Angola. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50 (7): 2493–2499.
- Chen CY, Wu KM, Chang YC, Chang CH, Tsai HC, Liao TL, Liu YM, Chen HJ, Shen AB, Li JC, Su TL, Shao CP, Lee CT, Hor LI, Tsai SF.** Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* 2003; 13(12): 2577-2587.
- Choury D, Aubert G, Szajnert MF, Azibi K, Delpech M, Paul G.** Characterization and nucleotide sequence of CARB-6, a new carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase from *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (2): 297-301.
- Christensen-Dalsgaard M, Gerdes K.** Two higBA loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Molecular Microbiology.* 2006, 62(2): 397–411.
- Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Manning PA.** VCR repetitive sequence elements in the *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron. *Molecular Microbiology.* 1997; 26(5), 1137–1143.
- Clark C, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning PA.** The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology*; 2000, 146: 2605–2612.

- Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM.** Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* 1993; 9(1): 41-52.
- Collis CM, Hall RM.** Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39 (1): 155–162.
- Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, Mendo S, Duarte A.** Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(9):2838-2843.
- Dabanch J, Herrero D, Pavéz C, Veas N, Braun S, Porte L.** Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect.* 2009; 26 (4): 360-362.
- Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D.** Distribution and Content of Class 1 Integrons in Different *Vibrio cholerae* O-Serotype Strains Isolated in Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000, 44(5): 1315–1321.
- De Lamballerie X, Zandolf C, Vignoli C, Bollet C, Demicco PP.** A one step microbial DNA extraction method using Chellex 100 suitable for gene amplification. *Res Microbial.* 1992, 143: 785-790.
- Di Conza JA, Gutkind GO.** Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología.* 2010; 42: 63-78.
- Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st edn.). 2005; *American Public Health Association*, Washington DC, USA.
- Eiler A, Johansson M, Bertilsson S.** Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(9): 6004-6011.

- Elmor M, Aquino C, Scaramal E, Ciola C, Schettino G, Machado M.** *V. vulnificus* Infection in São Paulo, Brazil: Case Report and Literature Review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2007; 11(2):302-305.
- Ferreira E, Costa M, Vaz Pato MV.** Resistance to antibiotics of *Vibrio cholerae* strains isolated in Angola. *Pathol Biol* (Paris). 1992; 40(5): 561-565.
- Fluit A & Schmitz F.** Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999, 18(11):761-70.
- Fluit A & Schmitz F.** Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol Infect*. 2004; 10(4):272-288.
- Fonseca EL, Santos Freitas F, Vieira V, Vicente A.** New qnr Gene Cassettes Associated with Superintegron Repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14 (7): 1129-1131.
- Franzon, V. L., Barker, A. & Manning, P. A.** Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose-resistant hemagglutinin of *Vibrio cholerae* O1 and construction of a mutant. 1993; *Infect Immun*; 61: 3032-3037.
- Gil A, Louis VR, Rivera IN, Lipp E, Huq A, Lanata CF, Taylor DN, Russek-Cohen E, Choopun N, Sack R, Colwell RR.** Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. *Environ Microbiol*. 2004; 6(7): 699–706.
- González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M.** Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. *Rev Méd Chile*. 2004; 132: 619-626.
- Guevara JM, Reyes N, Valencia E, Marocho L, Ferrer A, Huaroto L.** Primeros aislamientos y antimicrobianos de *Vibrio cholerae* en el Perú. *Rev Farmacol Terap (Lima)*. 1991; 1(1): 10-12.

- Guevara JM, Valencia E, Ticona E, Huaroto L, Valencia P, Torres D.** Resistencia in vitro del *Vibrio cholerae* O1 a seis antimicrobianos. *Bol Soc Per Med Int.* 1994; 7(4): 147-148.
- Guevara JM, Giraldo D, Mezarina E, Velarde N.** Resistencia in-vitro del *Vibrio cholerae* O1 a nueve antimicrobianos en la provincia constitucional del Callao. Abril - Junio 1998. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2000, 61 (2): 132-135.
- Hall R, Collis C.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995; 15(4): 593-600.
- Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH.** IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol.* 2002; 184(6): 1712-1721.
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM.** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2000; 406 (6795): 477-483.
- Ibarra J, Delgado A, Alvarado D.** Vibrios no epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 asociados a enfermedad diarreica aguda. Evento climatológico El Niño"-1998. Hospital Nacional 2 de Mayo. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 1999; 60(4):251-256.
- Ibarra JO, Flores LE, García RH, Alvarado DE.** Estudio preliminar de la resistencia de *Vibrio cholerae* O1, brote epidémico 1998, a antimicrobianos *Rev. Peru. Biol.* 2000; Vol. 7 (1).

- Ibarra JO, Alvarado DE.** Antimicrobial resistance of clinical and environmental strains of *Vibrio cholerae* isolated in Lima-Peru during epidemics of 1991 and 1998. *Braz J Infect Dis.* 2007; 11(1):100-105.
- Joss MJ, Koenig JE, Labbate M, Polz MF, Gillings MR, Stokes HW, Doolittle WF, Boucher Y.** ACID: annotation of cassette and integron data. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10:118.
- Kamiya H, Satou K, Hori M, Iida E, Ishiguro C, Harashima H.** Mutagenesis by damaged deoxyribonucleotides and its prevention by MutT-type hydrolyzing enzymes. 2004, *Nucleic Acids Symposium Series* No. 48: 271-272.
- Kruse H, Sørum H, Tenover FC, Olsvik O.** A transferable multiple drug resistance plasmid from *Vibrio cholerae* O1. *Microb Drug Resist.* 1995; 1(3): 203-210.
- Kumar P, Thomas S.** Presence of *dfp6* Gene Cassette in Superintegron of Non-O1/Non-O139 Strain of *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (11): 4959–4960.
- Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F.** Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 68(1):118-30.
- Le Roux F, Zouine M, Chakroun N, Binesse J, Saulnier D, Bouchier C, Zidane N, Ma L, Rusniok C, Lajus A, Buchrieser C, Médigue C, Polz MF, Mazel D.** Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol.* 2009; 11(8): 1959-1970.
- Leo T.** Resistencia a antimicrobianos en *Vibrio cholerae* O1. [Tesis para el Título] Lima: UNMSM 2000.

Lewin. Genes VIII. Pearson Prentice Hall®. 2004

Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médicas Editorial Ciencias Médicas. 2001. Tomo I pag: 333-339. La Habana-Cuba.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. *Science*. 1998; 280: 605-608.

Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, Trinanes J, Pazos Y, Garcia-Martin O. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2008, 74(1): 265-274.

Mizuno T, Sultan S, Kaneko Y, Yoshimura T, Maehara Y, Nakao H, et al. Modulation of *Vibrio mimicus* hemolysin through limited proteolysis by an endogenous metalloprotease. *FEBS J*. 2009;276(3):825-834

Nair GB, Bartram J, Havelaar AH, Hueb J, Jacob J. *Vibrio cholerae*. Guidelines for drinking-water quality. *World Health Organization*. Geneva-Switzerland 2002; 2da Edición: 119-142.

Nemergut D, Martin A, Schmidt S. Integron Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Mine Tailings and Inferences about Integron Evolution. *Applied and environmental microbiology*. 2004; 70(2): 1160–1168.

Núñez H, Ulloa MT, Guerra F, Osorio GC. Pathogenicity island region of clinical and environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*, isolated in Chile. *Rev Med Chile*. 2009; 137: 208-214.

Opintan JA, Newman MJ, Nsiah-Poodoh OA, Okeke IN. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the SXT element. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):929-33.

Ozgumus OB, Celik-Sevim E, Alpaya-Karaoglu S, Sandalli C, Sevim A. Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains

- isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J Microbiol.* 2007;45 (5): 379-387.
- Pan JC, Ye R, Wang HQ, Xiang HQ, Zhang W, Yu XF, Meng DM, He ZS.** *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(11): 3829-3836.
- Pariente M, Escribano E, Liria P, Crespo M.** *Vibrio metschnikovii* from a human infected leg ulcer. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50(5):311-312.
- Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes H W, Hall RM.** Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology.* 2000, 146, 2855–2864.
- Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, Skurray RA.** The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(4):761-768.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 24-38.
- Rajpara N, Patel A, Tiwari N, Bahuguna J, Antony A, Choudhury I, Ghosh A, Jain R, Ghosh A, Bhardwaj AK.** Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(3): 220-225.
- Ripabelli G, Sammarco ML, McLauchlin J, Fanelli I.** Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Syst Appl Microbiol.* 2003; 26(1): 119-126.

- Rosser SJ, Young HK.** Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Jul;44(1):11-18.
- Rotman E, Kuzminov A.** The MutT defect does not elevate chromosomal fragmentation in *Escherichia coli* because of the surprisingly low levels of MutM/MutY-Recognized DNA modifications. *J. Bacteriol.* 2007, 189(19): 6976–6988.
- Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D.** The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *PNAS*; 2001, 98 (2): 652-657.
- Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.** Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology.* 2002; 43(6): 1657–1669.
- Sacsaquispe R, Velásquez J.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 30. Lima-Perú. 2002.
- Sedas VT.** Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. *J Infect Dev Ctries.* 2007; 1(3): 224-241.
- Shi L, Fujihara K, Sato T, Ito H, Garg P, Chakrabarty R, Ramamurthy T, Fair G, Takeda Y, Yamasaki S.** Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *Journal of Medical Microbiology.* 2006; 55: 575–583.
- Schoolnik G, Yildiz F.** The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biol.* 2000; 1(3): reviews 1016.1 - 1016.3.

- Srinivasan V, Virk R, Kaundal A, Chakraborty R, Datta B, Ramamurthy T, Mukhopadhyay A, Ghosh A.** Mechanism of Drug Resistance in Clonally Related Clinical Isolates of *Vibrio fluvialis* Isolated in Kolkata, India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(7): 2428-2432.
- Stabili L, Gravili C, Boero F, Tredici SM, Alifano P.** Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* sp. AO1 growing in pure culture or in association with its hydroid host *Aglaophenia octodonta* (Cnidaria, Hydrozoa). *Microb Ecol.* 2010; 59(3):555-562.
- Stokes H, Hall R.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* 1989; 3(12): 1669-1683.
- Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell R, Colombo M.** Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class1 integrons. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 64: 45–54.
- Teo JW, Suwanto A, Poh CL.** Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(5): 1309-1314.
- Tolmos J.** Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Vibrio cholerae*. [Tesis de Bachiller] Lima: UPCH 1992.
- Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB.** The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14464–14469.
- Vaseeharan B, Ramasamy P, Murugan T, Chen JC.** In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus*

monodon hatcheries and ponds. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 26(4): 285-291.

Vora G, Meador C, Bird M, Bopp C, Andreadis J, Stenger D. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *PNAS*. 2005; 102 (52): 19109–19114.

Winn (h), Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 2008; Editora: Editorial Médica Panamericana S.A.; 6ta Edición, p:387.

Xiong XP, Wang C, Ye MZ, Yang TC, Peng XX, Li H. Differentially Expressed Outer Membrane Proteins of *Vibrio alginolyticus* in Response to Six Types of Antibiotics. *Mar Biotechnol* (NY). 2010. [Epub ahead of print].

Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F, Li Y, Peng S, Shao Q, Lu L, Ezaki T. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China. *Curr Microbiol*. 2009; 59(2): 113-117.

Zabala B, García K, Espejo RT. Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strain due to natural lysogenization by a telomeric phage. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(6): 1697-1702.

Zhang W, Meng DM, Pan JC, Zhu FY, Chen K. Characteristics of virulence gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from clinical patients and environment in Hangzhou, China. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2004; 38(3): 200-203.

Zhang R, Wang Y, Gu J-D. Identification of environmental plasmid-bearing *Vibrio* species isolated from polluted and pristine marine reserves of Hong Kong, and resistance to antibiotics and mercury. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006; 89: 307–315.

X. ANEXOS

Caldo Tripticasa de Soja (TSB)

	g/L
Triptosa	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agua destilada	1000 mL

Agar Tripticasa de Soja (TSA)

	g/L
Triptosa	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar-agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

Medio Moeller Base Descarboxilasa

	g/L
Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	5.0
Glucosa	0.5
Piridoxa	0.005
Rojo de cresol	0.005
Púrpura de bromocresol	0.01
Agua destilada	1000 mL
pH final (6.0 ± 0.2)	

<u>Agar TCBS (Tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa)</u>	g/L
Peptona de caseína	5,0
Peptona de carne	5,0
Extracto de levadura	5,0
Citrato sódico	10,0
Tiosulfato sódico	10,0
Bilis de buey	5,0
Colato sódico	3,0
Sacarosa	20,0
Cloruro sódico	10,0
Citrato de hierro	1,0
Azul de timol	0,04
Azul de bromotimol	0,04
Agar-agar	14,0
Agua destilada	1000 mL
pH (8,6)	

<u>Agua Peptonada Alcalina 2X</u>	g/L
Peptona	20,0
NaCl	20,0
pH (8,6)	

Oxidasa

Para el ensayo rápido de la enzima citocromooxidasa se inocula una colonia, previamente cogida con un mordadientes de madera estéril, a la zona

reactiva de la tira, la aparición de un color azul violeta indica la presencia de microorganismos oxidasa positivos.

Prueba de la Lisina y Ornitina.

La lisina y ornitina se agregan al medio basal (Medio Moeller), en concentración final al 1% (L-aminoácidos), o al 2% (DL-aminoácidos) para detectar la producción de enzimas específicas para estos sustratos.

<u>Caldo lactosado</u>	g/L
Extracto de carne	3,0
Peptona de gelatina	5,0
Lactosa	5,0
Púrpura de bromocresol	0.89
NaCl	10,0
Agua destilada	1000 mL

<u>Medio de SIM (H₂S-Indol-Motilidad)</u>	g/L
Levadura	10,0
Peptona de caseína	10,0
Peptona	6,0
Sulfato férrico amoníaco	0,2
Tiosulfato de sodio	0,2
Agar-agar	3,7
Agua destilada	1000 mL
pH (8,0)	

Prueba del Manitol en Medio de cultivo OF

	g/L
Peptona de caseína	2,0
Extracto de levadura	1,0
Cloruro de sodio	5,0
Hidrógenofosfato dipotásico	0,2
Azul de bromotimol	0,08
Agar-agar	2,5
Manitol	10,0

Caldo TSB con Cloruro de Sodio al 0, 1, 6, 7 y 10%

	g/L
Triptosa	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro de sodio	0, 1, 6, 7 ó 10
Agua destilada	1000 mL

Bromuro de Etidio (1µg/mL)

Bromuro de Etidio	1,0 µg
Agua destilada	1 mL

Solución TAE 50X

	g/100mL
Tris base	24,228
EDTA	1,8612
Ajustar a pH 8,0 con Ácido acético glacial	5,71 mL
Usar a 0.5X	

Buffer de carga 2X (DNA)

SDS	0,5%
Glicerol	25%
EDTA de sodio	12 mM
Azul de bromofenol	0,05%
pH	8,0

Agarosa 1 %

Buffer TAE	100 mL
Agarosa	1,0 g

Disolver la solución de agarosa en Baño María a 100 °C.

Solución de Lisis Alcalina I

50 mM de Glucosa

25 mM de Tris-HCl (pH 8,0)

Tris Base HCl

10 mM EDTA (pH 8,0)

Para preparar EDTA 0,5 M (pH 8,0), agregar 186,1 g de disodium EDTA.2H₂O a 800 mL de H₂O. Agitar y mezclar. Ajustar a pH 8,0 con NaOH (Esterilizar).

Solución de Lisis Alcalina II

0,2N (NaOH)

Recién diluido de una solución Stock de 10 N.

1% (w/v) SDS

Coger de una Solución Stock 20% (w/v), si es necesario ajustar a pH 7,2 agregando HCl concentrado.

La esterilización no es necesaria, de hacerlo, hacerlo por filtración.

Solución de Lisis Alcalina III

5 M de Acetato de Potasio, 60 mL del Stock 8 M

Ácido acético glacial 11,5 mL

H₂O 28,5 mL

El resultado de la solución es 3 M de Potasio y 5 M con respecto al Acetato.

Para el Acetato de K: preparar una solución Stock de 8 M, disolviendo 78,5 g de Acetato de potasio (PM = 98,14) en 30 mL de agua desionizada. Agregar H₂O desionizada o destilada hasta llegar a un volumen total de 100 mL. Esterilizar por filtración. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 1

Ubicación de las estaciones				
Cepa		Latitud	Longitud	Estación
A1	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
A5	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
A6	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
A7	<i>V. vulnificus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
B1	<i>V. alginolyticus</i>	12° 05'28"S	77°10'55"W	2
B2	<i>V. alginolyticus</i>	12° 05'28"S	77°10'54.7"W	3
B3	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'30,4"S	77°09'47,4"W	4
B4	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'30,4"S	77°09'47,4"W	4
F1	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
F2	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
F3	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'21.5"S	77°08'39.5"W	5
F4	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'21.5"S	77°08'39.5"W	5
F5	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'21.5"S	77°08'39.5"W	5
F6	<i>V. vulnificus</i>	12°00'31,8"S	77°08'31,9"W	6
H2	<i>V. damsela</i>	12° 05'27.5"S	77°10'54.7"W	7
H4	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
H5	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'30,4"S	77°09'47,4"W	4
H6	<i>V. vulnificus</i>	12° 02'34."S	77°08'55"W	8
H7	<i>V. damsela</i>	12° 02'34."S	77°08'55"W	8
H8	<i>V. alginolyticus</i>	12° 02'34."S	77°08'55"W	8
H10	<i>V. alginolyticus</i>	12° 02'34."S	77°08'55"W	8
I1	<i>V. vulnificus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
I2	<i>V. mimicus</i>	12°03'57.7"S	77°10'45,9"W	1
L1	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L2	<i>V. vulnificus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L3	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L4	<i>V. vulnificus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L5	<i>V. vulnificus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L6	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L9	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L10	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L11	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L14	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L15	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L16	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L17	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L19	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9

Ubicación de las estaciones				
Cepa		Latitud	Longitud	Estación
L20	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
L22	<i>V. cincinnatiensis</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M1	<i>V. vulnificus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M2	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M3	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M4	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M5	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M7	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M8	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M10	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M11	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M12	<i>V. cincinnatiensis</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M13	<i>V. cincinnatiensis</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M25	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M26	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M28	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M29	<i>V. cincinnatiensis</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M30	<i>V. carchariae</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M31	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M32	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M33	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M34	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
M35	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N1	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N2	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N3	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N4	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N5	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N6	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N8	<i>V. vulnificus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N10	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N11	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N14	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N15	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
N16	<i>V. cincinnatiensis</i>	12°03'35"S	77°09'53"W	9
β47	<i>V. alginolyticus</i>	12°07'54.2"S	77°08'22.89"W	10
β48	<i>V. vulnificus</i>	11°59'00.3"S	77°14'11.11"W	11
β49	<i>V. alginolyticus</i>	11°57'59.5"S	77°09'40.09"W	12

Ubicación de las estaciones

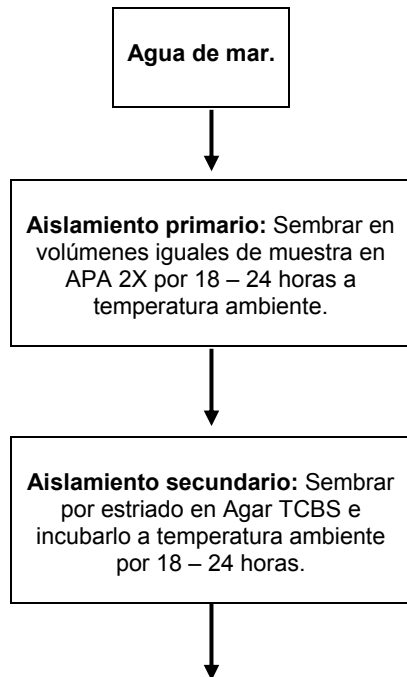
Cepa		Latitud	Longitud	Estación
β50	<i>V. alginolyticus</i>	11°54'00.0"S	77°10'11.30"W	13
β52	<i>V. carchariae</i>	11°54'00.0"S	77°12'42.41"W	14
β54	<i>V. alginolyticus</i>	11° 59' 44"S	77°08'09,4"W	16
β57	<i>V. damsela</i>	11°56'23.3"S	77°08'42.60"W	17
β58	<i>V. damsela</i>	11°56'23.3"S	77°08'42.60"W	17
β59	<i>V. alginolyticus</i>	12°02' 44.2"S	77° 08' 28"W	18
β61	<i>V. vulnificus</i>	11°59'00.3"S	77°14'11.11"W	11
β64	<i>V. alginolyticus</i>	12°07'13.0"S	77°09'26.95"W	19
β52b	<i>V. parahaemolyticus</i>	11°54'00.0"S	77°12'42.41"W	14
β71	<i>V. vulnificus</i>	12° 00'30.9"S	77° 08'16.9"W	20
β72	<i>V. carchariae</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
β73	<i>V. alginolyticus</i>	11° 56'43,5"S	77° 08' 13. 8"W	22
β75	<i>V. vulnificus</i>	12°07'13.0"S	77°09'26.95"W	19
β76	<i>V. alginolyticus</i>	11°52'39.5"S	77° 09' 23.3"W	23
β77	<i>V. alginolyticus</i>	12°08'02.0"S	77°14'11.11"W	24
β78	<i>V. parahaemolyticus</i>	12° 00'30.9"S	77° 08'16.9"W	20
α27	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
α29	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
α66	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°10'39.22"W	25
α67	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°11'39.99"W	26
α68	<i>V. parahaemolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°11'39.99"W	26
α69	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°14'11.11"W	24
α70	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°14'11.11"W	24
α71	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'17.4"S	77°15'38.17"W	27
α72	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'24.5"S	77°13'10.34"W	28
α73	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'24.5"S	77°13'10.34"W	28
α74	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'24.5"S	77°13'10.34"W	28
α75	<i>V. alginolyticus</i>	12°07'54.2"S	77°08'22.89"W	10
α76	<i>V. parahaemolyticus</i>	12°05'58.4"S	77°08'34.39"W	29
α77	<i>V. alginolyticus</i>	12°07'13.0"S	77°09'26.95"W	19
α78	<i>V. parahaemolyticus</i>	12°07'13.0"S	77°09'26.95"W	19
α79	<i>V. alginolyticus</i>	12°07'13.0"S	77°09'26.95"W	19
α80	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'24.7"S	77°08'38.16"W	30
α81	<i>V. parahaemolyticus</i>	12°04'24.7"S	77°08'38.16"W	30
β163	<i>V. alginolyticus</i>	12°06'37.6"S	77°07'31.97"W	31
β164	<i>V. alginolyticus</i>	11° 58'32.7"S	77° 07'59.7"W	32
β167	<i>V. alginolyticus</i>	11°54'00.0"S	77°10'11.30"W	13
β169	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°14'11.11"W	24

Ubicación de las estaciones				
Cepa		Latitud	Longitud	Estación
β170	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
β171	<i>V. vulnificus</i>	11°56'19.4"S	77°13'39.90"W	33
β175	<i>V. vulnificus</i>	12° 04' 04.8"S	77° 13' 26.3"W	35
β176	<i>V. alginolyticus</i>	11°52'39.5"S	77° 09' 23.3"W	23
β177	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'51.7"S	77°10'29.37"W	36
β179	<i>V. alginolyticus</i>	11°57'57.5"S	77°12'11.20"W	37
β180	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'0.33"S	77°09'31.9"W	38
β181a	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'14.6"S	77°10'19.51"W	39
β181b	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'14.6"S	77°10'19.51"W	39
β182a	<i>V. alginolyticus</i>	12°05'29.0"S	77°06'45.98"W	40
β182b	<i>V. alginolyticus</i>	12°05'29.0"S	77°06'45.98"W	40
β183	<i>V. carchariae</i>	12°05'29.0"S	77°06'45.98"W	40
β184	<i>V. alginolyticus</i>	12° 03' 38.9"S	77° 14' 20.8"W	41
β185	<i>V. alginolyticus</i>	12° 04' 16.6"S	77° 10' 23.2"W	42
β186	<i>V. alginolyticus</i>	12°06'54.00"S	77°12' 34.20"W	43
β187	<i>V. alginolyticus</i>	12° 03' 38.2"S	77° 14' 20.9"W	44
β188	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'17.4"S	77°15'38.17"W	27
β189	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
β191	<i>V. parahaemolyticus</i>	12° 04' 04.8"S	77° 13' 26.3"W	35
β192a	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'57.5"S	77°15'10.24"W	45
β193	<i>V. fluvialis</i>	11°56'19.4"S	77°13'39.90"W	33
β194	<i>V. metschnikovii</i>	11°59'00.3"S	77°14'11.11"W	11
β195	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'24.7"S	77°08'38.16"W	30
β196	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'15.5"S	77°10'39.22"W	25
β197	<i>V. alginolyticus</i>	12°06'39.60"S	77°12'13.80"W	46
β198	<i>V. alginolyticus</i>	12°06'39.60"S	77°12'13.80"W	46
β199	<i>V. fluvialis</i>	12°04'24.7"S	77°08'38.16"W	30
β201a	<i>V. alginolyticus</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β202	<i>V. alginolyticus</i>	12° 04' 04.8"S	77° 13' 26.3"W	35
β203	<i>V. carchariae</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β204	<i>V. alginolyticus</i>	12° 03' 38.9"S	77° 14' 20.8"W	41
β205	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'26.1"S	77°11'41.64"W	21
β206a	<i>V. fluvialis</i>	11° 58'32.7"S	77° 07'59.7"W	32
β209	<i>V. alginolyticus</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β210a	<i>V. metschnikovii</i>	12°04'24.7"S	77°08'38.16"W	30
β211	<i>V. alginolyticus</i>	11°56'23.3"S	77°08'42.60"W	17
β212	<i>V. fluvialis</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β213	<i>V. alginolyticus</i>	12° 04' 16.6"S	77° 10' 23.2"W	42

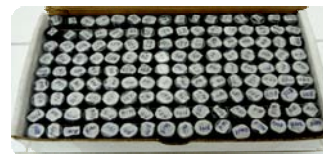
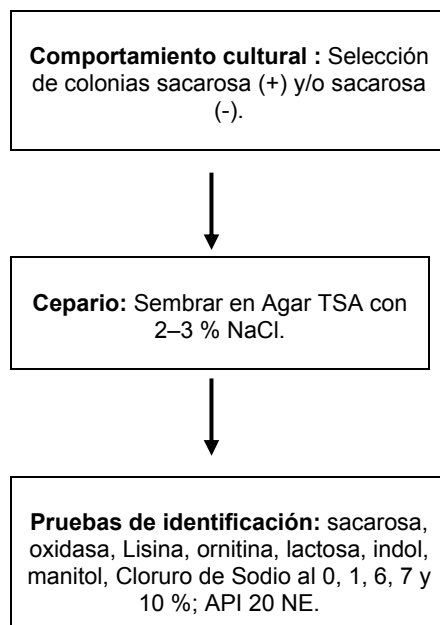
Ubicación de las estaciones				
Cepa		Latitud	Longitud	Estación
β214	<i>V. vulnificus</i>	12° 00'30.9"S	77° 08'16.9"W	20
β215a	<i>V. alginolyticus</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β218	<i>V. alginolyticus</i>	11°52'39.5"S	77° 09' 23.3"W	23
β219	<i>V. alginolyticus</i>	11°54'00.0"S	77°12'42.41"W	14
β221	<i>V. alginolyticus</i>	11° 59' 44"S	77°08'09,4"W	16
β222	<i>V. metschnikovii</i>	11° 59' 44"S	77°08'09,4"W	16
β223	<i>V. alginolyticus</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β224	<i>V. alginolyticus</i>	12°05'58.4"S	77°08'34.39"W	29
β226	<i>V. alginolyticus</i>	11°54'00.0"S	77°12'42.41"W	14
β227	<i>V. alginolyticus</i>	12°05'58.4"S	77°08'34.39"W	29
β228	<i>V. alginolyticus</i>	12°02'14.6"S	77°10'19.51"W	39
β192b	<i>V. alginolyticus</i>	12°04'57.5"S	77°15'10.24"W	45
β204b	<i>V. alginolyticus</i>	12°03'38.9"S	77°14'20.8"W	41
β215b	<i>V. alginolyticus</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β198b	<i>V. metschnikovii</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47
β201b	<i>V. damsela</i>	11°53'43.9"S	77°09'03.1"W	47

ANEXO 2

Organigrama del aislamiento de los Vibrios



IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA



ANEXO 3

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas de *Vibrio*.

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Ornitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM	
								0%	1%	6%	7%	10%		
A1	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>V. alginolyticus</i>
A5	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>V. alginolyticus</i>
A6	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
A7	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>V. vulnificus</i>
B1	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
B2	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
B3	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
B4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
F1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
F2	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
F3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
F4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
F5	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
F6	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
H2	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. damsela</i>
H4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
H5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>V. alginolyticus</i>
H6	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
H7	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. damsela</i>
H8	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
H10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
I1	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
I2	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>V. mimicus</i>
L1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior.

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Ornitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM	
								0%	1%	6%	7%	10%		
L2	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. vulnificus
L3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. vulnificus
L5	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. vulnificus
L6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L9	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L11	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L14	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L15	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L16	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L17	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L19	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L20	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L22	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
L35	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	V. cincinnatiensis
M1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. cholerae
M2	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. vulnificus
M3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
M4	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
M5	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
M7	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
M8	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus
M10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alginolyticus

Continuación de la tabla anterior

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Ornitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM	
								0%	1%	6%	7%	10%		
M11	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
M12	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>V. cincinnatiensis</i>
M13	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>V. cincinnatiensis</i>
M25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M26	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M28	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M29	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	<i>V. cincinnatiensis</i>
M30	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>V. carchariae</i>
M31	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
M32	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M33	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M34	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
M35	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
N1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N3	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N4	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N6	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
N8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
N10	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>V. alginolyticus</i>
N11	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
N14	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>V. alginolyticus</i>
N15	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Ornitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM
								0%	1%	6%	7%	10%	
N16	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. cincinnatiensis</i>
β47	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β48	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. vulnificus</i>
β49	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β50	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β52	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. carchariae</i>
β53	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β54	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β57	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. damsela</i>
β58	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. damsela</i>
β59	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β61	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β64	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β52b	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
β71	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β72	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. carchariae</i>
β73	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β75	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β76	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β77	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β78	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
α27	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α29	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
α66	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Omitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM
								0%	1%	6%	7%	10%	
α67	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α68	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
α69	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α70	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α71	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
α72	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α73	-	+	+		-		+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α74	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α75	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α76	-	+			-	-		-	+	+	+	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
α77	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α78	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
α79	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
α80	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
α81	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
β163	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β164	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β167	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β169	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β170	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β171	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β174	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β175	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β176	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Ornitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINa				RM	
								0%	1%	6%	7%	10%	
β177	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>V. alginolyticus</i>
β179	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	0	<i>V. alginolyticus</i>
β180	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β181a	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β181b	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β182a	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β182b	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β183	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	<i>V. carchariae</i>
β184	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β185	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β186	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β187	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	0	<i>V. alginolyticus</i>
β188	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β189	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	0	<i>V. alginolyticus</i>
β191	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
β192a	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β193	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. fluvialis</i>
β194	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>V. metschnikovii</i>
β195	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β196	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β197	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β198	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β199	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. fluvialis</i>
β201a	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior

Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Omitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINa				RM	
								0%	1%	6%	7%	10%	
β202	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β203	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. carchariae</i>
β204	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β205	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β206a	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. fluvialis</i>
β209	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β210a	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. metschnikovii</i>
β211	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β212	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. fluvialis</i>
β213	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β214	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. vulnificus</i>
β215a	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β216	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β218	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β219	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β221	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β222	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>V. metschnikovii</i>
β223	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β224	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β226	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β227	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β228	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>V. alginolyticus</i>
β192b	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>
β204b	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>V. alginolyticus</i>

Continuación de la tabla anterior														
Cepa	Sacarosa	Oxidasa	Lisina	Omitina	Lactosa	Indol	Manitol	CINA					RM	
								0%	1%	6%	7%	10%		
β215b	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	<i>V. alginolyticus</i>
β198b	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>V. metschnikovii</i>
β201b	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>V. damsela</i>

V. alginolyticus
V. metschnikovii
V. damsela